



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Estudio de genes con expresión
diferencial del camarón blanco del
Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone,
1931) en respuesta a dietas elaboradas
con fuentes convencionales y alternativas
de proteína

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
GABRIELA CHÁVEZ CALVILLO



Asesores: MVZ Ángel García Hernández
Dra. Ma. Leticia Arena Ortiz

México, D.F. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*Y seguimos caminando. De pronto, oímos una voz, que gritaba:
- ¡Este es el mar; el vasto y poderoso mar!
Y al acercarnos vimos que era un hombre que daba la espalda al mar
y que aplicaba un caracol a su oído, para oír el murmullo marino.
-Pasemos de largo -dijo mi alma.
Este es el realista;
el que da la espalda a todo lo que no puede abarcar de una mirada,
y se contenta con un fragmento del todo.*

Fragmento "El Loco" GIBRÁN KHALIL GIBRÁN

DEDICATORIAS

A mis padres: Margarita Calvillo y Gabriel Chávez. Por darme la mejor herencia: la educación. Por que han sido ejemplo de tenacidad y lucha, por su apoyo, su cariño, sus regaños y el amor a su familia, su entrega por el trabajo, por hacer mi vida alegre y enseñarme a ser libre, con mi profunda admiración.

A mis hermanos: Beto y Rockan, por su ligereza, sus bromas, sus risas, sus reclamos, observaciones y comentarios que me han hecho abrir los ojos.

Al Movimiento estudiantil de 1999, CGH. Por instruirme, por ayudarme a encontrar el gusto por la rebeldía y disponibilidad para luchar por la libertad y el equilibrio.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), numero IN216406-3 y CONACyT 49406.

Al técnico M en C. Gabriel Lizama Uc por su orientación, apoyo y tiempo dedicado a mi preparación en el laboratorio, por contribuir a mi formación académica y profesional y por su paciencia. Sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

A mi asesora Dra. Ma. Leticia Arena y a su esposo Biol. Javier Apodaca por sus revisiones, comentarios, sugerencias y aportaciones a este trabajo, pero sobre todo por su entereza y amistad. A Jose Juan Zúñiga.

Al Dr. Carlos Vázquez que durante la carrera me soportó a deshoras en su oficina, me envió con la duda sagrada de la probabilidad y me contagió su adicción a la investigación. Por leer y corregir este escrito, por iluminar mi camino. Y a mis sinodales que leyeron este trabajo, me señalaron los errores y aportaron sus conocimientos para fortalecerlo: MenC Cortéz, MVZ Castro, MVZ García y MVZ Naranjo.

Al pueblo mágico de Sisal: que me alojó en su playa y me alimentó con su mar por un año, por permitirme la oportunidad de contemplar el mundo con otra realidad. A sus habitantes: el Mesh, Mama Daisy, Choni, Don Félix, Pavito y a la comunidad internacional de la UMDI: a los carnalitos Alex y Felipe, a Wendy, Sara, Erchao, Pana y Oscar pulpo, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, por su gentileza, su calidez y amistad en todo momento.

A mis Amigas: A Janet, por leer y corregir este escrito, por compartir su vida conmigo, por su sinceridad, sus consejos, su inteligencia cubana que le da clarividencia y le permitió entenderme como nadie. A Ana, por dejarme entrar en su casa, en su tiempo, en sus planes y en su corazón. A las dos por las noches de desvelo, donde todo dijimos. A Zaida, por su amistad incondicional, su paciencia y todos los kilómetros corridos y nadados juntas.

A mi entrenador: Ing. Raúl Porta, por hacer de la natación mi pasión, por su ternura, sus consejos, por su dedicación al deporte, por la disciplina para luchar .

A los compadres: mis padrinos Mario y Marcela, por su cariño, su ayuda en todo momento, por las lecciones de economía, filosofía, y las más importantes, las lecciones de la vida. Por compartir su tiempo, su comida y sus experiencias.

CONTENIDO

	Página
Resumen	1
Introducción.....	2
Justificación y Objetivos.....	19
Material y Métodos	20
Resultados.....	30
Discusión.....	39
Conclusión.....	44
Referencias.....	45

RESUMEN

GABRIELA CHÁVEZ CALVILLO. Estudio de genes con expresión diferencial de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) en respuesta a dietas elaboradas con fuentes convencionales y alternativas de proteína. (Bajo la dirección de MVZ Ángel García Hernández y Dra. Ma. Leticia Arena Ortiz)

El camarón continúa siendo el producto pesquero más importante en la acuicultura. En esta industria la alimentación de los organismos representa entre el 50 al 70% de los costos de producción, la tendencia actual es a optimizar los niveles y calidad de las proteínas, probando fuentes alternativas para hacerlos mas económicos, y amigables con el medio ambiente. El reconocimiento de que los nutrientes y otros compuestos de los alimentos tienen la capacidad de interactuar y modular mecanismos moleculares que subyacen a las funciones fisiológicas ha provocado una rápida revolución en el campo de la nutrición. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de proteínas de origen vegetal y animal en la dieta en la expresión diferencial de genes en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Se extrajo y cuantificó el ARN de músculo y hepatopáncreas de cuatro grupos de camarones alimentados con dos dietas que contenían; una, proteína vegetal y otra con proteína animal. Se obtuvieron los cDNA's por RT-PCR. Los productos fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida urea y teñidos con plata. Las bandas identificadas como diferenciales fueron escindidas, eluídas, reamplificadas, clonadas y enviadas a secuenciar. Las secuencias obtenidas se buscaron en la base de datos del GeneBank.

Se observó que hubo una modificación en las poblaciones de mARN entre los tratamientos. Los genes encontrados se pueden agrupar de acuerdo a otras publicaciones, en ocho categorías de acuerdo a su función; metabolismo, respuesta inmune, reguladores de la transcripcion, genes que codifican para proteínas estructurales del músculo, reguladores de señalización celular, subunidades ribosomales y no reportados.

Estudio de genes con expresión diferencial de *L. vannamei* (Boone, 1931) en respuesta a dietas elaboradas con fuentes convencionales y alternativas de proteína.

1. ANTECEDENTES

1.1 Situación Actual del Sector Pesquero y Acuicultor

El aprovechamiento de los recursos pesqueros y acuícolas es un factor de seguridad nacional, pues estos recursos son parte importante del quehacer económico y social, por ser fuente importante de ingresos económicos y alimentos para la población, además de que aportan insumos para la industria y generan divisas por la venta de productos de alto valor. En el ámbito local, generan oportunidades de ingresos familiares, y de esa forma impulsan el desarrollo económico regional. Los recursos pesqueros son renovables, pero con una capacidad finita de renovación, por lo que se hace indispensable propiciar el cultivo de especies comerciales a gran escala, ya que la capacidad de captura de la pesquería ha rebasado las tasas de crecimiento de las poblaciones de camarón propiciando su sobreexplotación y favoreciendo que la pesquería se encuentre sobrecapitalizada.^{1,3}

La acuicultura es el sector de producción de alimentos de origen animal de crecimiento más acelerado en el mundo a una tasa de 8.8% desde 1970 y el camarón continúa siendo el producto pesquero más importante en lo que respecta al valor, representando el 50% del valor total de los productos pesqueros comercializados internacionalmente en 2006, y ocupa el primer lugar por generación de empleos directos e indirectos en el Pacífico mexicano.^{4,5}

Más de las tres cuartas partes de la oferta mundial de camarón de cultivo provienen del continente asiático, destacándose: Tailandia, China, Indonesia y la India que proveen el 75% de la oferta mundial, el resto de la producción proviene del occidente: EUA, Canadá, Brasil, Ecuador y México en donde a excepción de Brasil, el grueso de la extracción de camarón en América Latina se destina a la exportación, siendo así una actividad que genera además de proteína

de origen animal de primera calidad, empleos y divisas. México ocupa el onceavo lugar a nivel mundial en el sector camaronícola y el segundo en Latinoamérica después de Brasil, sin embargo, cuenta con una superficie litoral de 10,143km por lo que es considerado como un país con alto potencial de producción en este sector. La disponibilidad *per cápita* de crustáceos se ha triplicado desde 1961 hasta 2006 de 0.4kg a 1.4kg.^{1, 6-10}

1.2 Ventajas de *L. vannamei* frente a otras especies

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* es la especie de camarón que más se cultiva en el mundo debido a que presenta grandes ventajas en comparación con otros peneidos, dentro de las cuales podemos destacar: su alta tasa de crecimiento 3g/semana hasta 26g (que es la talla máxima usualmente cultivada de *L. vannamei*) bajo condiciones de cultivo intensivo (hasta 150 camarones/m²) y los machos hasta 1 g/semana por encima de los 20g, resiste densidades de cultivo muy elevadas más allá de 150/m² y en ocasiones hasta 400/m² en estanques con recirculación controlada. Tanto *P. monodon* como *L. stylirostris* pueden ser agresivos, tienen altos requerimientos de proteína y pueden ser más exigentes en la calidad de agua, haciendo difícil un cultivo tan intensivo como el de *L. vannamei*. Esta especie tolera un amplio rango de salinidad, desde 0.5-45 ppt, se siente cómodo entre 7-34 ppt pero crece particularmente bien en bajas salinidades entre 10-15 ppt (donde el medio y la hemolinfa son iso-osmóticos). Esta facultad lo convierte en un buen candidato para el cultivo continental que en los últimos años se ha vuelto muy común en Asia y América Latina; son muy tolerantes a bajas temperaturas (abajo de 15°C) permitiendo su cultivo en estaciones frías; tiene una tasa de Conversión Alimenticia (CA) baja, de 1.2; menor requerimiento proteico, 18-35 % de PC comparado con otros camarones: *Penaeus japonicus* 40-52%, *P. aztecus* 22.5-40%, *P. Schmitti* 25-35%, *P. indicus* 43%, *P. merguensis* 34-42%, *Litopenaeus stylirostris* 35-40% , *L. monodon* 34-50%, resultando en una reducción en los costos de operación y manejo en sistemas heterotróficos cerrados⁽¹¹⁾; tasas más altas de la supervivencia en la cría de *L. vannamei* y *P. stylirostris* 50-60% comparada con la de *P. monodon* (20-30%); si está tratado con hielo, para la poscosecha *L. vannamei* es resistente a la melanosis; y finalmente una ventaja en su comercialización es que el camarón blanco es generalmente preferido sobre el camarón tigre (*P. monodon*) debido al sabor.¹¹⁻¹⁷

1.3 Generalidades de la especie

El camarón blanco del Pacífico (ID Taxonómico: 6689) fue clasificado por Boone desde 1931 como: Eukaryota; Metazoa; Eumetazoa; Bilateria; Coelomata; Protostomia; Panarthropoda; Arthropoda; Mandibulata; Pancrustacea; Crustacea; Malacostraca; Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata; Penaeoidea; Penaeidae; *Penaeus vannamei* y reclasificado por Pérez Farfanto en 1997 como: *Litopenaeus*; *Litopenaeus vannamei*.¹⁸

Ha sido registrado desde Mazatlán, Sinaloa, México hasta Caleta La Cruz, Perú. Es una especie que habita también fondos arenosos y arcillosos. En México se distribuye desde la Bahía de Yavaros, Sonora hasta la frontera con Guatemala, y su distribución no es uniforme en todo el litoral. El camarón blanco del Pacífico es menos abundante con respecto al camarón azul desde Yavaros, Sonora hasta el río San Lorenzo, Sinaloa; sin embargo, desde este río hasta Nayarit es la especie dominante. La mayor abundancia se encuentra entre las 5 y 15 brazas de profundidad en el mar.^{5, 7, 18, 19}

Esta especie requiere de una temperatura en agua de 22 a 34°C, su óptimo es de 28°C. En su estadio adulto se distingue de las demás familias de peneidos por la presencia de dos dientes en la región ventral del *rostrum* y de ocho o nueve en la región dorsal, además de que las hembras presentan un télico abierto sin receptáculo seminal.¹⁹

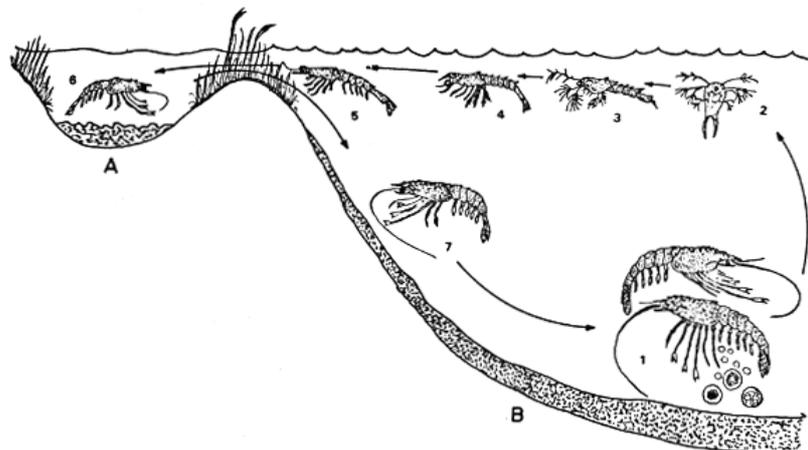
La maduración y reproducción de esta especie se realiza en aguas profundas, entre 15 y 60m; las hembras fecundadas ponen huevos en cantidades variables (entre 10.000 y 1.000.000). Al cabo de un tiempo, éstos eclosionan en una serie de estadios denominados larvas, cada uno de los cuales tiene características morfológicas determinadas y diferentes requerimientos nutricionales. El cuadro 1 muestra los distintos estadios larvales, forma de alimentación y comportamiento.^{7, 8, 19}

ESTADIO (# de sub- estadios)	DURACIÓN DEL ESTADIO	ALIMENTACION PRINCIPAL	COMPORTAMIENTO
Huevo	14 hrs	No ingiere alimento del medio externo, aprovecha vitelo	Se deposita en el fondo
<i>Nauplius</i>	3 días	Sus propias reservas	Locomoción por antenas,

(6)			planctónicas
<i>Protozoa</i> (3)	3 días	Filoplancton	Planctónicas, natación por apéndices cefálicos
<i>Mysis</i> (3)	5 días	Zooplancton	Planctónicas, natación por apéndices del tórax
Postlarvas (35 a 60 según el autor)	35-60 días	Zooplancton y posteriormente alimentación omnívora	Los primeros estadios son planctónicos, luego de hábitos bentónicos, natación por pleópodos

Tabla 1.1 Estadios larvales, alimentación y comportamiento de los peneidos, generalidades.

Las Postlarvas (PL) y/o juveniles migran hacia la costa, a aguas menos profundas y de baja salinidad(A): por ejemplo, zonas de manglar, esteros, lagunas, ricas en materia orgánica, donde crecen hasta alcanzar estadios de adulto o preadulto migrando luego a mar abierto (B) para madurar y reproducirse. El ciclo de vida de los peneidos se ejemplifica en la figura 2, ahí se observa como a medida que el organismo va teniendo necesidades nutricionales distintas, busca un hábitat donde pueda satisfacerlas modificando con ello su tracto digestivo, sufriendo adaptaciones fenotípicas a corto plazo le permiten aprovechar la disponibilidad de los nutrientes contenidos en los diferentes



alimentos.^{19, 20}

Figura 1.1 Ciclo de vida de los camarones peneidos. Donde A, son sitios de baja profundidad y baja salinidad, y B, aguas saladas.¹⁹

1.4 Ciclo de la Muda en crustáceos decápodos

El camarón como todos los crustáceos, necesita remover y reemplazar periódicamente su exoesqueleto rígido para seguir creciendo. Cuando el animal pierde su viejo exoesqueleto, inmediatamente comienza a absorber agua aumentando su volumen con lo cual la nueva cutícula se expande; luego el volumen ocupado por el agua es reemplazado por medio de hiperplasia muscular y en esa forma el camarón crece. El período de muda es crítico, el camarón se encuentra desprotegido, es fácil presa de predadores, siendo ésta la etapa en la cual se observa una mayor mortalidad. Existen problemas de regulación iónica, debido a la toma de agua y a los cambios en la permeabilidad de las membranas. Este proceso es una fuente intrínseca de variaciones etológicas, fisiológicas e inmunitarias. Dichas variaciones, sumadas a la pérdida de la cutícula, son algunos de los factores que probablemente influyen en el metabolismo y actividad enzimática de los crustáceos.^{19, 21}

El ciclo de muda fue dividido por Drach (1936) en cinco estadios para los peneidos con base en sus cambios tegumentarios: Postmuda (A, B), Intermuda (C), Premuda (Do, D1,D2,D3) y Ecdisis (E).^{19, 21, 22}

	Estadio de Muda	Duración del ciclo (%)²³	Características generales
Postmuda	A B	2.5% 16.5%	Período de turgencia debido a la absorción de agua; los animales no se alimentan
Intermuda	C	21%	Período de actividad secretora de la epidermis, crecimiento de los tejidos, el animal se alimenta
Premuda	D	60%	Se inicia la reabsorción del antiguo exoesqueleto y comienza a formarse una nueva cutícula, el animal no se alimenta.
Exuviación o ecdisis	E	0.5%	Pérdida del viejo esqueleto.

Tabla 1.2 Ciclo de la muda en crustáceos decápodos, características generales.¹⁹

1.5 Alimentación del camarón

En el pasado eran erróneamente considerados como detritívoros, sin embargo desde 1977 se han venido realizando estudios sobre los hábitos alimenticios que han demostrado que los camarones peneidos son omnívoros, y que algunas especies presentan tendencias hacia la carnivoría o a la herbivoría. En general las especies del subgénero *Farfantepenaeus* presentan hábitos omnívoro-carnívoros, mientras que las especies del subgénero *Litopenaeus* tienen hábitos omnívoro-herbívoros.²⁴⁻²⁷

De acuerdo con Mc. Tigie y Zimmerman (1991), estas tendencias están asociadas con diferentes proporciones de materia de origen animal o vegetal en la dieta por lo tanto evidencian requerimientos nutricionales distintos. Se ha observado que diferencias en los hábitos alimenticios y en los requerimientos nutricionales están asociadas también con la capacidad de las especies de utilizar en diferentes proporciones a las proteínas como sustrato metabólico, si la actividad de las enzimas digestivas es afectada por las proteínas de la dieta y estas a su vez son responsables de la cantidad de energía disponible entonces en última instancia el tipo y calidad de alimento ofrecido será el modulador de la cantidad de energía fisiológicamente útil.²⁸

1.6 Sustitución de proteína de origen animal con proteína de origen vegetal

La alimentación representa entre el 60 hasta 80% del Costo Total en las explotaciones ya sean intensivas, semiintensivas o extensivas, por eso es generalmente el primer objetivo a modificar en las estrategias para hacer rentable una empresa camaronera. Además los efectos ambientales que provoca la camaronicultura por ser una actividad económica en crecimiento están regulados por la NOM-001-ECOL-1996 la cual establece los Límites Máximos Permisibles de Nitrógeno Total (NO_2 y NO_3) en los efluentes, ya que los residuos metabólicos de N en grandes cantidades resultan en una eventual eutrofización del medio acuático.²⁹⁻³¹

Por esta razón es necesario desarrollar mejores estrategias de producción por medio de la formulación de alimentos balanceados (dietas) que sean amigables con el ambiente, que contengan las cantidades mínimas de nutrimentos para el crecimiento óptimo de los camarones y la mayor digestibilidad de sus ingredientes.

Las proteínas son indispensables para el mantenimiento de las funciones básicas de cualquier animal, sin embargo en los camarones juegan además un papel indispensable en la obtención de energía, ya que metabólicamente se prefieren para la obtención de ATP que los carbohidratos (como sucede en vertebrados).³²

Los niveles de proteína de la dieta deben optimizarse para reducir los costos de producción, ya que este macronutriente es el mayor componente en cantidad de los alimentos en camarones y también el más costoso pues se utilizan convencionalmente ingredientes como harinas de calamar y/o de pescado. Pero una vez establecidos los requerimientos proteicos del camarón, se pueden desarrollar dietas que sustituyan la proteína convencional con una proteína alternativa proveniente de fuentes vegetales, que son más baratas y menos contaminantes. Sin embargo hay que tomar en cuenta que aún cuando diferentes ingredientes tienen la misma cantidad de proteína cruda, su aprovechamiento puede ser distinto debido a su digestibilidad, perfil aminoacídico y factores antinutricionales endógenos que comúnmente se encuentran en los vegetales, por lo que su utilización es limitada. El ingrediente comúnmente utilizado como fuente de proteína alternativa (vegetal) es la soya (*Glycine max*), esta leguminosa contiene inhibidores de proteasa, factores antitripsicos, glucosinolato, ácido fítico e inhibidores de vitaminas, por lo que la respuesta de los camarones a este tipo de alimento cambia con respecto a la dieta con proteína animal.^{13, 16, 24, 27, 33-36}

Como se menciona anteriormente, los camarones tienen la ventaja de ser omnívoros oportunistas por su naturaleza demersal, por ello, se busca encontrar cómo y hasta qué punto éstos organismos son capaces de aprovechar la plasticidad de sus mecanismos adaptativos a diferentes ingredientes para poner a su disposición los nutrimentos contenidos en las dietas y así poder utilizarlos en los procesos fisiológicos de importancia económica, como el crecimiento, calidad de la carne y resistencia a enfermedades.^{13, 25, 27, 34, 35}

1.7 Nutrición del camarón

Es necesario conocer los requerimientos nutricionales en cuanto a cantidad de proteína y perfil aminoacídico, debido a que son constituyentes de la estructura y función de los organismos para su mantenimiento, síntesis de tejidos, anticuerpos, hormonas, receptores celulares y otras proteínas que actúan a nivel molecular y se reflejan en el crecimiento, calidad de la carne,

sobrevivencia, fertilidad y prolificidad de los animales. La proteína es el principal nutrimento utilizado en altas concentraciones en las dietas de los peneidos para la generación de biomasa y como sustrato energético, tiene una consideración nutricional importante porque es el principal nutriente limitante para el crecimiento, puede ser asimilada y utilizada para proporcionar energía y puede no ser depositada para el crecimiento y contribuir a afectar la calidad del agua vía excreción de nitrógeno (N).²⁷

Si bien los camarones en proceso de domesticación están bien adaptados a vivir sin carbohidratos dietéticos, ya que aprovechan la energía del esqueleto de carbono de las proteínas, con el consiguiente gasto de energía empleado en la excreción de los desechos nitrogenados, especialmente el amonio (NH_4) hay que considerar también que las necesidades nutricionales cambian a medida que avanza la edad de éstos animales y con respecto a su estadio de muda y éstos cambios en los hábitos alimenticios, llevan a diferencias en la producción de enzimas digestivas para no perder oportunidad de obtener de la mayor parte de los nutrientes del alimento, por eso se les conoce como omnívoros oportunistas, ya que presentan una amplia gama de enzimas digestivas, tales como: endoproteinasas, exoproteinasas, esterases no específicas, amilasas, glucosidasas, lipasas, maltasa, sacarasa, celulasa, exoquitinasa, colagenasas, laminarina y sus diferentes isoformas. Además, la sustitución de alimento natural por artificial en el cultivo de organismos representa modificaciones en la capacidad de adaptación del sistema digestivo y la expresión genética de las enzimas digestivas. Existe una gran cantidad de isoenzimas generadas ya sea por diferencias entre las poblaciones, durante el ciclo de muda, o por la calidad de los sustratos en los alimentos sin embargo pueden existir otros cambios a nivel molecular que repercutan en la expresión genética de los individuos dados por diferentes regímenes alimenticios. Es decir que diferentes regímenes alimenticios pueden influir en la expresión de genes, no sólo de enzimas digestivas sino de cualquier otro proceso.^{15, 37, 38, 38, 39}

1.8 Fisiología de la digestión

En los crustáceos la digestión comienza en la zona cardiaca del estómago y se continúa en los túbulos del hepatopáncreas (HP) o glándula digestiva, este es el órgano de mayor tamaño en los crustáceos decápodos (Figura 2) y sus funciones biológicas son: la síntesis y secreción de enzimas digestivas, absorción y digestión de productos dietéticos, mantenimiento de reservas minerales y

sustancias orgánicas del metabolismo de carbohidratos y lípidos, distribución de reservas almacenadas durante el ciclo de muda y catabolismo de algunos componentes orgánicos.^{33, 37, 40}

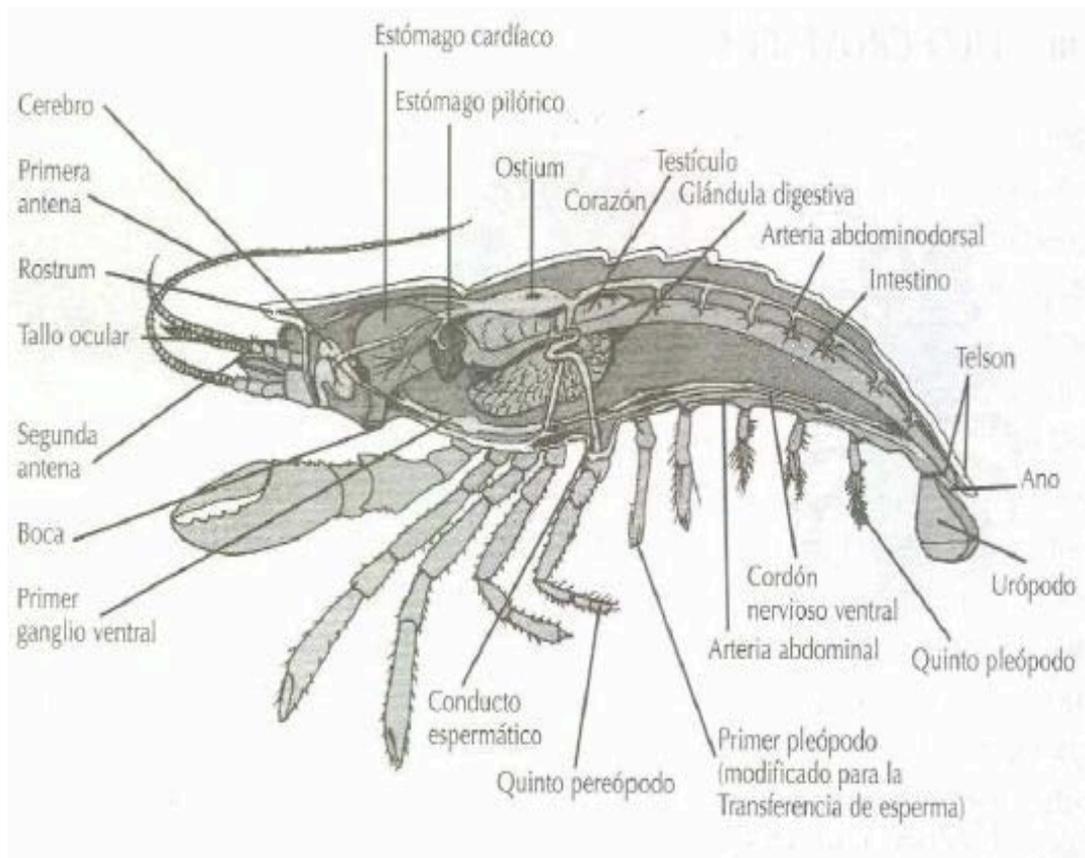


Figura 1.2 Esquema de la posición de los órganos de un crustáceo. Como se puede apreciar, la mayor parte de los órganos se encuentran en el cefalotórax.

El HP es una glándula conspicua bilobulada, rodeada por tejido conectivo, que desemboca en el estómago pilórico. Está compuesta por túmulos simples, con un extremo ciego, limitados externamente por tejido conectivo. En cada túbulo se definen tres zonas: distal, media y proximal. El epitelio está formado por cuatro tipos de células: E (embrionarias), F (fibrilares), R (reabsorción), y B (secretoras).^{34, 39, 40}

Este órgano ocupa el mayor volumen del cefalotórax y representa el 6% del peso corporal, su color es variable entre café, rojo, verde, amarillo o azul en dependencia del tipo de reserva almacenada, ya que las dietas vegetales contienen derivados de xantofilas y carotenos como β -carotenos y zeaxantina, provenientes de las algas, que dan coloración al HP. En estos animales la digestión química de las proteínas comienza en la cavidad cardiaca del estómago y continúa en los túmulos del HP.^{34, 39, 40}

1.9 Metabolismo de los macronutrientes

El modelo de degradación de proteínas es similar al de los vertebrados. Comienza con la hidrólisis de las proteínas de la dieta por las endopeptidasas, degradación de los péptidos por las exopeptidasas y la absorción a nivel de células especializadas del HP. Sin embargo hay diferencias importantes que modifican ese modelo general como es la no acidificación del medio estomacal durante la digestión, la escasa actividad quimotriptica, la ausencia de elastasa y existencia de una colagenasa digestiva y de una proteasa de bajo peso molecular y por último de la aparente inexistencia de cimógenos. La tripsina por sí sola representa el 60% de la actividad proteasica del HP en crustáceos peneidos, la importancia de esta enzima y su especificidad hacia los aminoácidos esenciales en la nutrición de crustáceos hace resaltar el problema de la calidad de proteínas utilizadas en su alimentación. Éstas proteínas deben contener aminoácidos esenciales en cantidad óptima pero también aminoácidos que permitan una hidrólisis rápida de proteínas. Además, el efecto de inhibidores naturales de tripsina presentes en ingredientes como la soya es muy marcado en los crustáceos debido a la importancia de esta enzima. Hay estudios que demuestran que la forma en que otros nutrientes como los carbohidratos son mejor asimilados, es cuando se incluyen en la dieta en forma de carbohidratos complejos, como el almidón. Esto se debe a que en forma de monosacárido, la glucosa puede interferir en la absorción de otros nutrientes ya que satura rápidamente los sitios activos, inhibiendo la captación de aminoácidos y afectando por ende el crecimiento. Los carbohidratos en exceso producen daños en el HP y en las branquias, limitando físicamente a las células encargadas de almacenar este nutriente. Puesto que el camarón tiene limitada capacidad para usar los carbohidratos de la dieta a consecuencia de la adaptación metabólica para el uso de proteínas como fuente de energía, por ello, las proteínas son el mayor sustrato de reserva en estos organismos y estas pueden ser convertidas en carbohidratos por medio de gluconeogénesis y desaminación de las cadenas carbonadas que forman a los aminoácidos.^{16, 24, 25, 34, 35, 37, 41, 42}

1.10 Consideración microbiológica

Cabe señalar que Gill (2003) afirma que en realidad el metabolismo resulta de la interacción entre los atributos fenotípicos de los organismos y su ecosistema microbiano. Investigaciones recientes revelan que del universo de bacterias sólo el 1% corresponden a bacterias cultivables mediante las técnicas clásicas desarrolladas desde el siglo XIX, del resto se detectó su presencia apenas hace unos años a través del análisis de su material genético, por ello se conocen como *metabacterias*, pues se caracterizan los genes presentes en ese sistema biológico e indirectamente los microorganismos a los que esos genes pertenecen. En humanos, la presencia de microbiota en el tracto gastrointestinal facilita la digestibilidad y asimilación de algunos nutrientes de origen vegetal de difícil digestión, como resultado de su metabolismo se producen: ácido láctico, ácido acético y ácido butírico que sirven como fuente de energía, acidifican el medio y esta disminución del pH permite la solubilización de minerales como el Ca y Mg, sintetizan vitaminas liposolubles como la K y el complejo B, así como algunos otros nutrimentos, también se ha reportado que modulan el sistema inmune, constituyen una barrera de inmunidad inespecífica, hay mecanismos bacterianos que provocan un efecto antagónico entre prebióticos y bacterias infecciosas como la producción de sustancias de defensa, la ocupación de receptores específicos en las células del intestino, o la estimulación del sistema inmune humano, es decir que hay comunicación entre la microbiota y el hospedero, esta influencia de las bacterias en el nivel más básico del funcionamiento celular permite activar o inhibir la expresión fenotípica de los organismos que albergan a estos microorganismos. Esta es una rama de la microbiología que apenas está siendo explorada, no se tienen reportes de la función de las *metabacterias* en peneidos, por lo que se tiene que considerar al hablar de nutrición y metabolismo que se está obviando una parte importante de la actividad de la microbiota. En humanos la mayor parte de la microbiota que viene de los productos fermentados muere al no resistir el paso por el estómago dadas sus condiciones de acidez, sin embargo en camarones no existe acidificación estomacal y siendo animales pelágicos de hábitos bentónicos se sospecha que pudiesen tener una carga microbiana importante con su consecuente actividad.⁴³⁻⁴⁸

Se ha demostrado la existencia de una enorme diversidad de especies de *Vibrio* y *Bacillus* en el HP de *L. vannamei* sanos y se ha reportado también el efecto de probióticos aislados del HP como *Vibrio* P62, *Vibrio* P63 y *Bacillus* P64, así como la inoculación de *Bacillus* S11, *Lactobacillus* spp. aislados del intestino

de pollos que mejoran el crecimiento y sobrevivencia de juveniles de *P. monodon*. Es importante hacer notar que la población de microbiota endógena depende de la genética del individuo, la nutrición y los factores ambientales. Las dietas vegetales contienen carbohidratos fermentables que incrementan la estabilidad y diversidad de la microbiota y estimulan el crecimiento de algunos microorganismos benéficos para el hospedero.⁴⁹⁻⁵²

1.11 Genómica nutricional

El reconocimiento de que los nutrientes y otros compuestos en los alimentos tienen la capacidad de interactuar y modular mecanismos moleculares que subyacen a las funciones fisiológicas ha provocado una rápida revolución en el campo de la nutrición. El surgimiento de la nutrigenética y la nutrigenómica, dos disciplinas con distintos enfoques a descifrar la interacción entre la dieta y los genes pero con un punto en común, que es la optimización del alimento ofrecido, provee de un acercamiento complejo a las interacciones entre las moléculas nutricionales, los polimorfismos genéticos y el sistema biológico como un total. Como una nueva ciencia, la nutrigenómica trae consigo terminología nueva, técnicas experimentales distintas, y fundamentalmente una nueva aproximación a la investigación nutricional. Los resultados de estas nuevas investigaciones crearán enormes oportunidades para entender como los alimentos modulan la expresión genética, la biosíntesis de proteínas y el metabolismo. La nutrigenómica es el estudio científico que combina la nutrición, la genética y la biología molecular, para elucidar la capacidad de respuesta de los genes de los organismos hacia los componentes bioactivos de los alimentos, este concepto se construye bajo las siguientes premisas:⁵³⁻⁵⁵

- a) La dieta y sus componentes tienen la capacidad de actuar directa o indirectamente en la expresión de genes y en los productos de esos genes.
- b) Los nutrimentos de la dieta pueden compensar potencialmente o atenuar los efectos de los polimorfismos genéticos.
- c) Las consecuencias de la dieta son dependientes del balance entre salud y enfermedad y el *background* genético.⁵³⁻⁵⁷

Estas interacciones entre los componentes bioactivos de los alimentos y los productos de los genes pueden modificar un número importante de procesos a nivel celular asociados con el balance hormonal, señalización celular, control del ciclo celular, apoptosis y angiogénesis que se reflejan como indicadores de

crecimiento, supervivencia, parámetros reproductivos e inmunidad. Además, interfieren con la estabilidad del material genético en los procesos de reparación y expresión.⁵⁵⁻⁵⁸

Para determinar los efectos y mecanismos por medio de los cuales la alimentación, sus componentes individuales y combinaciones de ellos regulan los procesos metabólicos dentro de las células, es necesario integrar el conocimiento de otras tecnologías de la genómica funcional (transcriptómica, proteómica, metabolómica) que junto a la bioinformática, la bioquímica, y la nutrigenómica brinden el esclarecimiento de los procesos básicos que constituyen el metabolismo y como sus componentes y pautas alimentarias inciden sobre este.^{53, 55, 58}

Esta rama de la biotecnología es ampliamente utilizada en la producción animal por sus potenciales aplicaciones en el mejoramiento de la productividad a través de buscar qué ingredientes intervienen en el crecimiento y calidad de la carne, o cuáles mejoran la utilización de los alimentos y con ello reducen las concentraciones de ciertos componentes (N, metales pesados) en los efluentes.⁵⁹

La interrelación entre la nutrición y expresión génica se manifiesta en dos sentidos: la influencia que los nutrimentos ejercen sobre la expresión génica y la síntesis de proteínas (nutrigenómica), y la influencia del fenotipo (por medio de los polimorfismos) sobre los requerimientos nutricionales (nutrigenética). Y se pueden entender en tres aspectos concretos: 1) qué genes son regulados por factores nutricionales, 2) cómo determinados nutrientes ejercen la regulación de la expresión génica, 3) cómo está involucrada la expresión génica en el metabolismo y el aprovechamiento de los nutrientes.^{54, 60}

Las dietas vegetales son ricas en componentes bioactivos como fitoquímicos, antioxidantes, PUFA's, vitaminas o sus precursores. Estas sustancias provocan cambios en la expresión fenotípica de proteínas, sin embargo en camarones aún no se tienen estudios previos sobre este tema.^{34, 61}

1.12 Regulación de la Expresión Genética

Uno de los mayores misterios de la vida desde un punto de vista fisiológico consiste en conocer cómo miles de genes (25 mil en el caso del ser Humano) integrados en el Genoma son expresados de forma regulada y coordinada en el plano temporal y espacial para dar lugar a los diferentes tejidos y órganos, a la vida. El crecimiento, el desarrollo, las enfermedades, los mecanismos de

adaptación a diferentes ambientes y la alimentación generan numerosos cambios drásticos en la expresión de los genes de las células en diferentes tejidos y órganos.⁶²

Al proceso en que la información codificada por un gen se convierte en las estructuras constituyentes y funcionales de la célula, se le conoce como expresión genética. Es esta habilidad para cambiar estructura y función en respuesta directa o indirecta al ambiente, permite un rango de fenotipos a desarrollar a partir de un solo genotipo. Cada célula contiene una copia completa de todo el genoma del organismo, pero no todos los genes se expresan en los diferentes tipos de células, depende de la función de la célula en un tejido particular además existe la especificidad temporal, por lo que aún un solo tipo celular se expresa de manera inconstante a través del tiempo.⁶³

En la célula, un gen (una sección de la molécula de DNA codificante) es copiado (*transcrito*) hacia RNA mensajero (mRNA) por medio de la enzima RNA-polimerasa, el mRNA se madura y sale del núcleo de la célula hacia el citoplasma en donde tiene contacto con los ribosomas. Es ahí donde el código genético del mRNA se *traduce* en una proteína por medio del acoplamiento de RNA's de transferencia (tRNA's) que tienen los anticodones para incorporar los aminoácidos en el orden establecido por el mRNA. Entonces, las proteínas y algunos mRNA's regresan hacia el núcleo donde reprimen la transcripción de sus propios genes. A esto se le conoce como regulación de la expresión genética.

⁶³⁻⁶⁵

1.13 Procesamiento del RNA

El RNA es el acrónimo del Ácido Ribonucléico (por sus siglas en inglés), es una molécula con características muy peculiares: monocatenario, con extremos 5'-3', lineal, contiene una pentosa de azúcar (Ribosa), una base nitrogenada (Adenina, Guanina, Citosina o Uracilo -que en la molécula de DNA corresponde a la Timina-) y un grupo fosfato PO₃.⁶³

Las RNAPolimerasas son las enzimas responsables de la síntesis de las tres clases principales de RNA eucariótico, la Pol I para el RNA ribosomal (rRNA), constituyente de los ribosomas, Pol II para el RNA de transferencia (tRNA), el cual acarrea a los aminoácidos hacia la síntesis de proteínas en los ribosomas, la Pol IV que participa en el silenciamiento genético a través de la síntesis de RNA de interferencia (iRNA).^{63, 65}

Los rRNA tienen tamaños definidos para cada especie y de la subunidad ribosomal en que se encuentren; mientras que los mRNA tienen una gran variedad de tamaños de acuerdo con el tamaño de las proteínas codificadas y los tRNA son todos similares, de entre 70 y 90 bases.

Una célula eucarionte contiene $\sim 10^5$ mg de RNA, del cual entre el 80 al 85% es rRNA y entre el 15 y el 20% son especies menores como los tRNA y los RNA pequeños nucleares. Se considera que, dependiendo del requerimiento celular en la síntesis de proteínas, entre el 1 y el 5% del total corresponde a mRNA, del cual la mayoría está poliadenilado (Poli-A).^{63, 65}

El mRNA es el indicador de la expresión genética, pues es el mediador entre TODA la información contenida en el genoma y la expresión fenotípica como respuesta hacia el ambiente en un tiempo determinado. Como el DNA se encuentra protegido en el núcleo de las células eucariontes, el mRNA tiene la difícil tarea de atravesar el núcleo, viajar a través del citoplasma y batir los peligros que representan las endonucleasas que ahí se encuentran hasta llegar a los ribosomas con el mensaje de la transcripción dictado por el núcleo. Es por eso que necesita estar encapuchado, esta capucha es agregada enzimáticamente por una Guaniltransferasa específica como un residuo de 7-metilguanosina (0, 1 ó 2 dependiendo del nucleótido metilado) unida por enlace 5'-5' fosfodiéster, y ésta define el sitio de inicio de la traducción. Además el mRNA maduro está poliadenilado, lo que significa que al salir del núcleo se le adicionan varias bases de Adenosina en el otro extremo (3') esto se le conoce como cola de Poli-A, y su longitud es variable, se reportan secuencias de adición de esta base desde 20 hasta 250 nucleótidos. Contrario al DNA, el RNA por ser monocatenario y no presentar superenrollamiento, es muy inestable, sin embargo el *caping* y la poliadenilación hacen que los mRNA's maduros sean moléculas estables, aumentan el tiempo de vida de la molécula incluso fuera del núcleo.⁶³

En eucariontes, las proteínas están codificadas por genes dentro de los cuales se encuentran secuencias correspondientes a intrones y exones, las cuales son transcritas en mRNA. Los intrones tienen que ser removidos y los exones se empalman uno junto a otro en un proceso conocido como *Splicing*, así el mRNA formado puede ser utilizado para formar una proteína. Los RNA's pequeños nucleares (snRNA) están involucrados junto con otras proteínas en este proceso formando el *Spliceosoma*.⁶³

1.14 Análisis de la Expresión Diferencial

Existen muchas técnicas para estudiar la expresión diferencial de genes, y muchas de ellas se complementan unas a otras, estos análisis varían en cuanto a complejidad, costos, sensibilidad de detección, obtención de falsos positivos, número de muestras a comparar, pero sobre todo la elección de alguna o algunas de ellas en este trabajo está fuertemente determinada por el desconocimiento del transcriptoma del *L.vanammei*, haciendo imposible utilizar algún otro análisis. En la tabla tres se muestra la comparación de algunas de las técnicas de análisis más utilizadas en los últimos tres años.⁶⁶

Tabla 1.3 Técnicas para analizar la expresión diferencial.

Técnica	Número de comparaciones	Detección de la expresión	RNA requerido	Diferencias detectables
Despliegue Diferencial	Cualquiera	5'-3', 3'-5'	≤5µg de mRNA total por 240 reacciones	1 a 1
Hibridización sustractiva (HS)	2	Una dirección	1-5µg de mRNA por reacción	>10
RDA	2	Una dirección	1-5µg de mRNA por reacción	>15
SSH	2	Una dirección	1-5µg de mRNA por reacción	>10
SAGE	Cualquiera	5'-3', 3'-5'	>5µg de RNA total por reacción	Todas
Microarreglos DNA	2 (más con normalización)	5'-3', 3'-5'	≥10µg de mRNA por <i>slide</i>	>2
Técnica	Umbral de detección	Complejidad	Costo	Redundancia
DD	Baja a media	Media	Medio	Media
HS	Media	Alta	Bajo	Media a alta
RDA	Media	Alta	Bajo	Media a alta
SSH	Media	Alta	Bajo	Baja

SAGE	Baja de media	Alta	Bajo a medio	Alta
Microarreglos	NA	Depende	Alto	NA
Técnica	Detección de nuevos genes	Falsos Positivos	Detección Diferencial en el <i>Splicing</i>	Análisis Genético Global
DD	Si	Alto	Si	No
HS	No	Bajo	Si	No
RDA	No	Bajo	Si	No
SSH	No	Bajo	Si	No
SAGE	No	NA	No	Si
Microarreglos	Generalmente no	NA	No	Si

Tabla 1.3 Comparación de diferentes técnicas de análisis de la expresión diferencial. Tomada de

66

1.15 Despliegue Diferencial

Es una técnica desarrollada por Liang P y Stein J (1992), para estudiar la expresión genética en organismos eucariontes, ésta técnica ha producido una enorme cantidad de literatura desde su aparición, es utilizada en la investigación primaria y en el diagnóstico de algunas enfermedades. Su poder reside en la combinación de tres técnicas utilizadas frecuentemente en Biología Molecular que permiten visualizar y comparar patrones de expresión genética entre dos o más muestras. Requiere de una retro-transcripción de RNA poliadenilado, una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del transcrito inverso complementario cDNA utilizando cebadores (Oligo-dT) y gel de electroforesis de poliacrilamida (PAGE).⁶⁶⁻⁶⁸

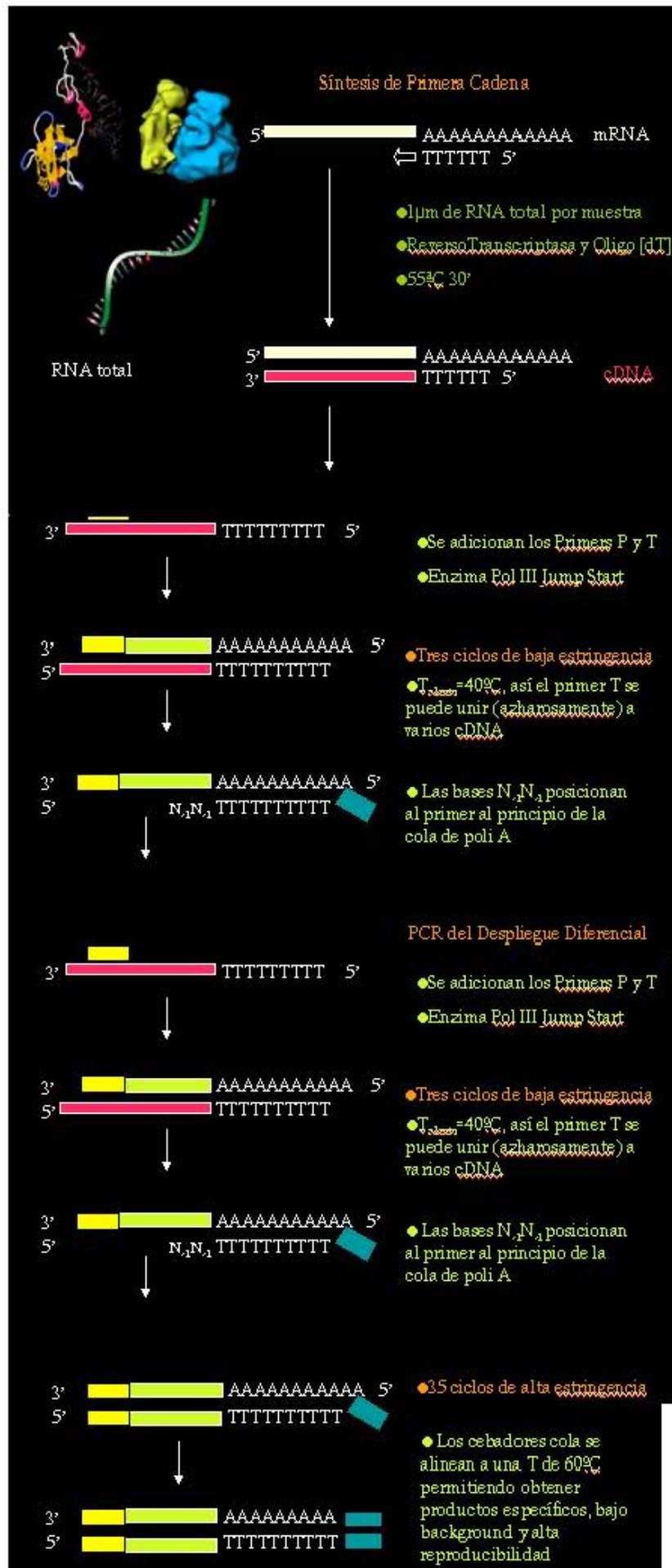
Primero, el RNA total es retro-transcrito utilizando una transcriptasa inversa con cebadores diseñados para empalmarse con el extremo 3' de poli-A de la población de RNA mensajero (mRNA). El resultado es un cDNA que será después utilizado como templado en la PCR, utilizando cebadores que también se empalman al extremo 3' de poli-A (Oligo-dT) en combinación con cebadores universales (*Primer P*) (en la figura 1.3 se observa un diagrama detallado desde la síntesis de primera cadena hasta el Despliegue Diferencial). El producto es desnaturalizado y visualizado en un Gel Desnaturalizante de Urea Poliacrilamida (PAGE) teñido con Nitrato de Plata (AgNO_3) en dónde se aprecia la expresión diferencial por medio de huellas de DNA (*DNA fingerprints*). En el

gel las *DNA fingerprints* son entonces fácilmente comparadas y las diferencias en la expresión pueden apreciarse. Los genes responsables de esa expresión pueden ser aislados y caracterizados. Las bandas de los *DNA fingerprints* son seleccionadas cuidadosamente, se cortan del gel, se reamplifican por PCR para confirmar su aparición, luego pueden ser ligadas a un vector de clonación, insertadas por transformación a bacterias químicamente competentes y mandadas a secuenciar.^{66,67}

Esta técnica posee grandes ventajas para la evaluación de la expresión diferencial, se pueden analizar cualquier número de muestras, se detecta expresión río arriba y río abajo (5'←→3'), se requiere poca cantidad de RNA ($\leq 5\mu\text{g}$ para 240 reacciones), se detectan diferencias una por una pero pueden ser una o más, el umbral de detección es de bajo a medio, es una técnica de baja complejidad, tiene la capacidad de detectar genes nuevos, pero tiene la gran desventaja de generar falsos positivos. Sin embargo por medio de la clonación del segmento en bacterias transformadas, la secuenciación y la confirmación por PCR-Tiempo Real se validan los resultados obtenidos.⁶⁶

En este trabajo se eligió esta herramienta como un método válido para el análisis de la expresión diferencial en *L. vannamei* pues se desconoce hasta la fecha el transcriptoma de éstos organismos.

Figura 1.3 Esquema detallado de la síntesis del cDNA a partir del RNA total y el protocolo del Despliegue Diferencial.



1. MATERIAL Y METODOS

1.1 Lugar e instalaciones

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias de la UNAM en Sisal, Yucatán, que se encuentra entre las coordenadas 21°10'02" Norte y 90° 01'50" Este.

1.2 Material biológico

Se emplearon muestras congeladas de animales de un experimento previo^{69, 70} identificados como *Litopenaeus vannamei* que provenían de La Paz, Baja California, de la empresa "Acuicultores del Pacífico", que posteriormente fueron transportados a Tabasco, a la granja camaronera "Hermanos Peña Benítez", en donde se llevó a cabo la cría larval mediante el método de Galveston (Smith, et al., 1993), 10 000 individuos llegaron a la UMDI en estadio de postlarva (PL) 15. En esta etapa, su alimentación constó de *Artemia salina* (3naup/ml), microalgas *Tetraselmis chuii* (20,000cel/ml) y pellet (40% de proteína animal, tamizado a menos de 350µm). Se mantuvieron en estas condiciones hasta llegar a PL25. Una vez en PL25 hasta Juveniles tempranos comenzaron a alimentarse con las dietas presentadas en la Tabla 3.^{69, 70}

1.3 Dispositivo experimental

El experimento constó de dos fases. La primera, con una duración de 36 días en los cuales se administraron dos dietas, una con origen proteico vegetal y la otra con origen proteico animal. La segunda fase tuvo una duración de 54 días, en donde se invirtieron las dietas de la mitad de los animales de cada tratamiento como se explica en la Figura 4.1, obteniendo así cuatro grupos: los camarones alimentados en la primera y segunda fase con la dieta animal (AA), los camarones alimentados en la primera fase con la dieta animal y en la segunda fase con la dieta vegetal (AV), los camarones alimentados en la primera y segunda fase con la dieta vegetal (VV), y los camarones alimentados en la primera fase con la dieta vegetal y en la segunda fase con la dieta animal (VA). Para confirmar que los patrones de expresión se deban a la Fuente de Origen de

la Proteína de la Dieta (FOPV), se compararon los grupos: AA contra AV, y VV contra VA.

Los camarones se mantuvieron bajo condiciones de fotoperiodo idénticas (12 horas luz:12 horas oscuridad), se alimentaron 3 veces al día, se controlaron: salinidad 28 ppm, temperatura, oxígeno disuelto constantes.

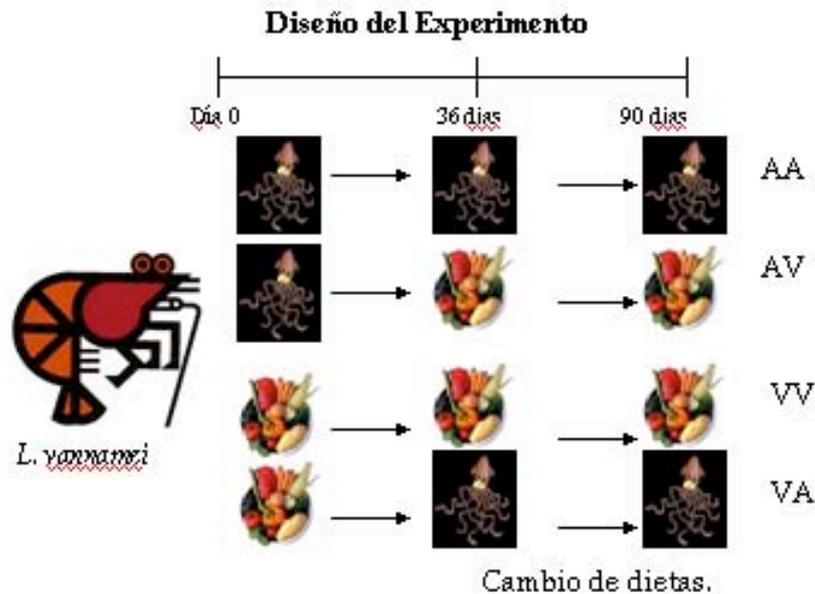


Figura 4.1. Esquema del diseño del experimento.

1.4 Las dietas

El alimento ofrecido tiene que tener características particulares para que el camarón lo ingiera debido a que es un alimento artificial que el animal no reconoce como su fuente de nutrientes. Por ello se han estudiado ampliamente éstas particulares originando algunos puntos con que el alimento debe cumplir además de los requerimientos nutricionales del camarón en el estado y condición en que se encuentre, con otras características tales como: tamaño de partícula (<500µm), flotabilidad, textura, microaglutinación, atrayentes

Las dietas fueron diseñadas por la Dra. Gabriela Gaxiola con base a los requerimientos óptimos de proteína reportados para *L. vannamei* (45% PC). La intención fue tener dos dietas idénticas en cuanto a valor nutricional variando la fuente de origen de la proteína por medio de la incorporación de ingredientes de origen vegetal (concentrado proteico de soya, concentrado proteico de papa, gluten de trigo y alga espirulina), por los de origen animal (harina de calamar), sin embargo la dieta vegetal incluye 9% de hidrolizado proteico de pescado LT(low temperature) como atrayente, Ver Tabla 4.1, para que el camarón se

interese por el alimento ofrecido, pues se trata de un ingrediente con proteínas hidrolizadas (aminoácidos y ácidos nucleicos libres) de bajo peso molecular que promueven la quimirecepción a larga distancia por estímulos sobre las antenas y anténulas en el camarón, pero el porcentaje tan bajo de inclusión de este ingrediente no contribuye significativamente al aporte de proteína metabolizable en la dieta vegetal.^{15, 17, 24}

Porcentajes de Inclusión de los Ingredientes en la Dieta		
Ingredientes	Dieta Animal (Calamar)	Dieta Vegetal (Cocktail)
Hidrolizado proteico de pescado LT	16 %	9 %
Pasta de soya	15%	0.0%
Harina de Trigo	14%	10,5 %
Harina de calamar	30%	0.0%
Concentrado proteico de Soya	0.0%	30 %
Concentrado proteico de Papa	0.0%	5 %
Gluten de Trigo	0.0%	9 %
Alga espirulina (<i>Spirulina maxima</i>)	0.0%	9 %
Aceite de Bacalao	3.5 %	5 %
Lecitina de Soya	2 %	2 %
Colesterol	0.5 %	0.5 %
Almidón	14.4714 %	16.05 %
Vitamina C	0.0286 %	0.45 %
Vitaminas	2 %	1 %
Aglutinante	1 %	1 %
Zeolita (Marcador para digestibilidad)	1.5 %	1.5 %
Total	100 %	100 %

Tabla 4.1 Tabla que muestra composición y proporción de ingredientes que componen las dietas con que fueron alimentados los juveniles para este experimento.

Aún con ingredientes distintos, se puede ajustar el valor nutrimental de las diferentes dietas por medio de la estimación de los nutrimentos contenidos en

Valor Nutricional de las Dietas		
Nutrimento	Animal (Calamar)	Vegetal (Cocktail)
Lípidos	9.42 %	9.92 %
Carbohidratos	25.25 %	24.64 %
Proteína Cruda	46.81 %	43.56%
Energía Digerible kJ/g	17	15

los ingredientes que las componen. Como se observa en la tabla 4.2, se consideran dietas isoproteicas e isoenergéticas.

Tabla 4.2. Valor Nutricional de dietas, obtenido por AQP de una muestra de cada una una vez ya elaboradas.

1.5 Elección del estadio de muda

Fenómenos como la muda parecen estar basados en los ritmos endógenos de crecimiento, sensibilidad a la luz y en los ritmos circadianos . Este proceso junto con el de la reproducción, son los dos eventos fundamentales en la vida de los crustáceos. Los cambios estructurales y morfológicos que operan durante el ciclo de muda se reflejan en variaciones bioquímicas y fisiológicas en diferentes tejidos, especialmente en la hemolinfa y el HP. En el momento de la ecdisis, el

agua es un constituyente necesario para el aumento de volumen del organismo antes de empezar el proceso de mineralización del nuevo exoesqueleto, asimismo durante el ciclo de muda, las reservas orgánicas se guardan y se transportan, entre otras cosas, para ser usadas en este proceso de formación del nuevo exoesqueleto.³⁵

Debido a que se ha reportado expresión diferencial en enzimas digestivas dada por el ciclo de muda se tuvo que escoger un estadio para eliminar este factor en el estudio.³⁹

Se decidió estudiar a los camarones en estadio C o intermuda, porque es la etapa del ciclo de la muda donde el camarón ingiere alimento y lo metaboliza de manera estándar.

El estadio de muda se determinó observando un urópodo al microscopio siguiendo el protocolo descrito por Robertson *et al*, 1987.

Se tomaron muestras de dos tejidos: HP y músculo de los juveniles en estadio "C" en el momento del sacrificio e inmediatamente se congelaron en Nitrógeno líquido (-70°C).

1.6 Obtención del RNA total

Se obtuvo el RNA total de cada tejido de acuerdo a la variación del protocolo de Chomczynski, 1993; Valenzuela *et al*, 2005 con el uso de:

- Trizol (Tiocianato de Guanidina 0.8M, Tiocianato de Amonio 0.4M, Acetato de Sodio 0.1M pH 5.0, Glicerol 5% y Rojo de Fenol 0.1%), para la lisis celular de la membrana plasmática, como agente caotrópico para la desnaturalización de proteínas y solubilización del tejido.
- Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1) para separar los compuestos fenólicos, carbohidratos, lípidos y proteínas y precipitar los Ácidos Nucléicos.
- Isopropanol para precipitar el RNA total.
- Citrato de sodio 0.8 M/Cloruro de Sodio 1M, que brinda al RNA total una mayor densidad para poder ser separado del DNA genómico.
- Cloruro de Litio y Acetato de Sodio, para la limpieza final y purificación del RNA total

Los RNA's de cada tejido se suspendieron en Agua Tratada con Dietilpirocarbonato (H_2O_{Tx} c/DEPC), la mayor dificultad en la extracción del RNA es evitar la contaminación con RNAsa, una enzima muy estable que no requiere cofactores para su función. Por lo tanto, todas las soluciones se prepararon con agua tratada con DEPC (0.1% v/v, esterilizada) con la finalidad de inactivar las ribonucleasas por modificación covalente, el DEPC es un agente alquilante muy activo con capacidad para alquilar los aminoácidos de las proteínas, alterando su estructura y en consecuencia su actividad biológica, produce una etoxiformación de los residuos de histidina de las RNAsas, destruyendo su actividad hidrolítica. Los materiales resistentes al calor se muflaron a $500^{\circ}C$ por 4 horas y los de plástico se trataron con Hidróxido de Sodio al 5% por 3 horas y luego enjuagados con H_2O_{Tx} c/DEPC.

1.7 Cuantificación/Evaluación de la Calidad del RNA

La concentración y pureza fueron determinados por un espectrofotómetro de absorbancia UV (260 y 280nm). Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm y las proteínas a 280nm, la relación entre estas dos lecturas da un cociente que se utiliza como referencia para saber si hay contaminación proteínas y sales (230nm). La relación A_{206}/A_{280} del RNA debe estar cerca de 2.⁷¹

La integridad del RNA se verificó usando electroforesis en geles de agarosa ultrapura al 1.2% con Buffer TAE 1x (50mM Tris, 1mM Ácido acético, 2mM EDTA pH8.5), cargando 1 μ l de RNA con 2 μ l de *Buffer* de Carga (Glicerol 30% en agua tratada con DEPC, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% bromuro de etidio) ya que aunque se tenga cuantificado y esté libre de DNA, no se descarta que pueda estar degradado. La visualización por el transiluminador de luz UV confirmó el fraccionamiento del RNA total de acuerdo a su peso molecular y en todos los casos del tejido muscular se observaron bandas correspondientes al RNA ribosomal de las subunidades 28S y 18S, los hepatopáncreas mostraban un barrido que indicó que había demasiada cantidad de RNA total, por lo que se realizaron diluciones hasta obtener definición en las bandas con la dilución 1:10.^{65, 71, 72} Todas las muestras se ajustaron por medio de diluciones hasta obtener la misma concentración (1 μ g/ μ l) de RNA.

1.8 Elaboración de *pools* por tratamiento

Una vez homogeneizadas las concentraciones de RNA, se prosiguió a realizar una mezcla con todos los individuos que pertenecieran al mismo tratamiento para cada tejido. Así se formaron *pools* de los 4 tratamientos (AA, AV, VV, VA) con los 2 tejidos (músculo y HP).

1.9 RT-PCR para la obtención de cDNA y PCR para el Despliegue Diferencial

Por medio de una RT-polimerasa (SuperScript™ III One-Step, Invitrogen CatNo.12574-026) se obtuvo a partir de 2µl de los *pools* de RNA para cada tratamiento la síntesis de primera cadena de cDNA con un cebador Oligo-[dT] convencional, ésta población de cDNA's de cadena sencilla resultante se amplificó por PCR de larga distancia por la Platinum® *Taq* DNA Polimerasa en la misma reacción. Se utilizaron 5 combinaciones con 5 cebadores arbitrarios P (28µM) y 3 cebadores Oligo-dT de anclaje T (25 µM).

Reacción de PCR con One-Step, Invitrogen		
	1 Rxn	[Final]
2x Reaction Mix (buffer con 0.1mM de cada dNTP, 3.2 mM MgSO ₄)	10µl	1x
RNA [1µg/µl]	1µl	1µg
Cebador de anclaje [28 M/µl]	0.5µl	1.4 µM
Cebador Oligo-[dT] [26 µM/µl]	0.5µl	1.4 µM
SuperScript™ III RT/ Platinum® <i>Taq</i> Pol.	0.8µl	
Agua Sigma	7.2µl	cbp
TOTAL	20µl	

Para la confirmación de las bandas diferenciales y evadir los falsos positivos por posición en el termociclador, se corrieron las muestras por duplicado, es decir, de la reacción final de 20µl se colocaron 10µl en un tubo y el restante como su réplica.

El control de DNA se hizo para cada combinación de cebadores con una mezcla de cada uno de los *pools* correspondientes a las dietas AA, AV, VV y VA de cada tejido por medio de la PCR con una DNAPolimerasa III (2xReadyMix

JumpStar *Taq*, Sigma No.Cat.P0982 7.5µl, Mix de los pools de RNA 1µl, cebador de anclaje 1µl, cebador Oligo-[dT] 1µl, Agua Sigma 4.5µl, con un volumen final de 10µl por reacción) y se colocó en el termociclador con el mismo ciclo del Despliegue Diferencial (1x (55°C 30'), 1x(94°C 5', 40°C 5', 68°C 5'), 2x(94°C 2', 40°C 5', 68°C 5'), 35x(94°C 1', 60°C 1', 68°C 2'), 1x(10'), 1x(4°C ∞).

Los cebadores P arbitrarios fueron diseñados por la empresa CLONTECH y sintetizados por el IBT-UNAM en Cuernavaca, Morelos con base en la secuencias nucleotídicas de motivos comúnmente encontrados en las regiones codificantes de los mRNA's eucariontes. Debido a que estos cebadores son más largos que los usados comúnmente, el paso de alineamiento (o hibridación) en los ciclos de PCR puede efectuarse a temperaturas mas altas, lo cual disminuye el fondo inespecífico. Además el proceso de PCR de larga distancia reduce el número de ciclos en la PCR con lo cual disminuye las mutaciones en las secuencias de cDNA.

Los cebadores Oligo-[dT] de anclaje son específicos para seleccionar poblaciones de mRNA exclusivamente por tener en su extremos 3' una secuencia de 9 bases repetitivas (Timinas) que se unen a las colas de Poli-A de los mRNA's maduros.

Las combinaciones entre los cebadores se realizaron al azar, en donde:

Cebadores Arbitrarios utilizados en el Despliegue Diferencial		
Identificación	Secuencia (5' - 3')	Concentración (pM/µl)
P1	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA	28
P3	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG	25.01
P5	ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG	26.45
P6	ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG	27.30

y...

Cebadores de anclaje Oligo-[dT] utilizados en el Despliegue Diferencial		
Identificación	Secuencia (5' - 3')	Concentración

		(μM)
T1	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAA	25.2
T2	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAC	21
T4	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCA	26.51
T6	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTCG	24.66
T7	CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTGA	28.59

1.10 Electroforesis del Gel de Poli-Acrilamida PAGE

A los productos de la PCR se les adicionó $1/3$ del volumen final de cada reacción (10 μl) de Solución de Paro (10mM NaOH, 0.05% Xylene cianol, 0.05% Azul de bromofenol, 95% Formamida) y se desnaturalizaron a 94°C por 3 minutos e inmediatamente se metieron al hielo frapé.

El gel desnaturalizante de Poliacrilamida Urea (7M Urea, TBE 1x, Acrilamida-Bisacilamida (39:1) 6%, TEMED 215 μl , Persulfato de Amonio 0.1% 365 μl) se precorrió a 33mA (potencial constante) por 1 hora con buffer TBE (45mM Tris, 45mM Ácido Bórico, 0.5M EDTA pH 8.0), se lavaron perfectamente los pozos y se cargaron 5 μl del cDNA d/s desnaturalizado. Para correr en la electroforesis con TBE 1x a 70 W (corriente constante) por 3:15 horas siguiendo el protocolo descrito por Liang-Perg 1992.⁷³

El PAGE se tiñó con Nitrato de Plata y se reveló con Carbonato de Sodio para ser observado en un transiluminador de luz blanca donde se fotografió y se recuperaron todas las *fingerprints* de cDNA expresadas diferencialmente.⁷⁴

1.11 Reamplificación de las bandas diferenciales

Las bandas identificadas como diferenciales fueron escindidas del gel y eluídas en 20 μl Agua Sigma para resuspender el cDNA por calentamiento 94°C 15', esta suspensión se tomó como templado para la PCR.⁷⁵

La reamplificación se llevó a cabo en reacciones con: 2xReadyMix JumpStar *Taq*, Sigma No.Cat.P0982 5 μl , cDNA templado [5-10ng/ μl] 4.7 μl , cebador de anclaje 0.15 μM , cebador Oligo-[dT] 0.15 μM , con un volumen final de 10 μl . Las condiciones de la amplificación fueron: 1x (94°C 5'), 20x (94°C 1', 60), 1x(68°C 10'). Los productos de esta PCR fueron visualizados en geles de Agarosa ultrapura al 2% con Bromuro de Etidio. Las bandas reamplificadas de los tamaños esperados fueron confirmadas como positivas.

1.12 Ligación del segmento de interés al vector de clonación

Se procedió a ligar los productos de PCR confirmados en vectores de clonación PGEM[®]-T easy, Promega (Cat.No. A1360) como especifica el proveedor (2x Rapad Ligation Buffer, T4 DNA Ligasa 5µl, PGEM[®]-T easy 1µl, T4 DNA Ligasa 1µl y producto de la reamplificación por PCR 1µl en 10µl de Agua ultrapura) durante toda la noche a 4°C para aumentar la eficiencia de la ligación. Se tomaron 5µl de la ligación para transformar bacterias *E.coli* DH5_α previamente preparadas químicamente con Cloruro de Rubidio (TfbI, TfbII) para transformarlas por medio de Choque Térmico (42°C 50" → 4°C 2'), se extendieron en cajas preparadas con medio Psi (ψ) (Extracto de levadura 5g, Tryptona 20g, Sulfato de Mg 5g y Agar 15g /por Litro, pH 7.6) con Ampicilina (10mg/ml) y X-gal (20µl) y se dejaron incubando a 37°C por 16 horas.

Como vehículo de expresión de los productos clonados se utilizó el vector de clonación PGEM[®]-T easy, Promega (Cat.No. A1360) está flanqueado por sitios de reconocimiento para EcoRI y NotI, contiene un gen de resistencia contra la Ampicilina (*Amp^r*) y una deleción en la región 5' del gen *LacZ* para la β-galactosidasa (ver Figura 4.2) que permite hacer la selección de colonias por color, pues el fragmento insertado permite la inactivación del péptido y no es posible ver el cromóforo X-gal. Las bacterias que incorporaron el vector sin inserto fueron α-complementadas, degradaron el X-gal (se ven azules) y no fueron seleccionadas. Las colonias blancas que acoplaron el vector sin α-complementación fueron tomadas como positivas. Se sembraron 5 colonias positivas por cada caja, es decir, por cada banda en tubos con medio ψ por 12 horas a 37°C, 250rpm y se extrajeron los plásmidos clonados por el método de Mini-preparación por lisis alcalina con recuperación por Sílica. Se linearizaron los vectores y se corroboró la presencia del inserto por medio de la digestión con la enzima de restricción EcoRI, visualizados en geles de agarosa al 1%.^{76, 77}

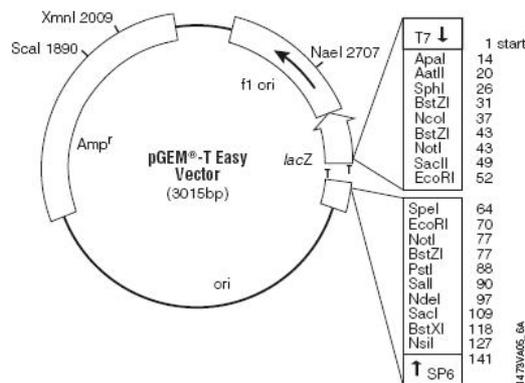


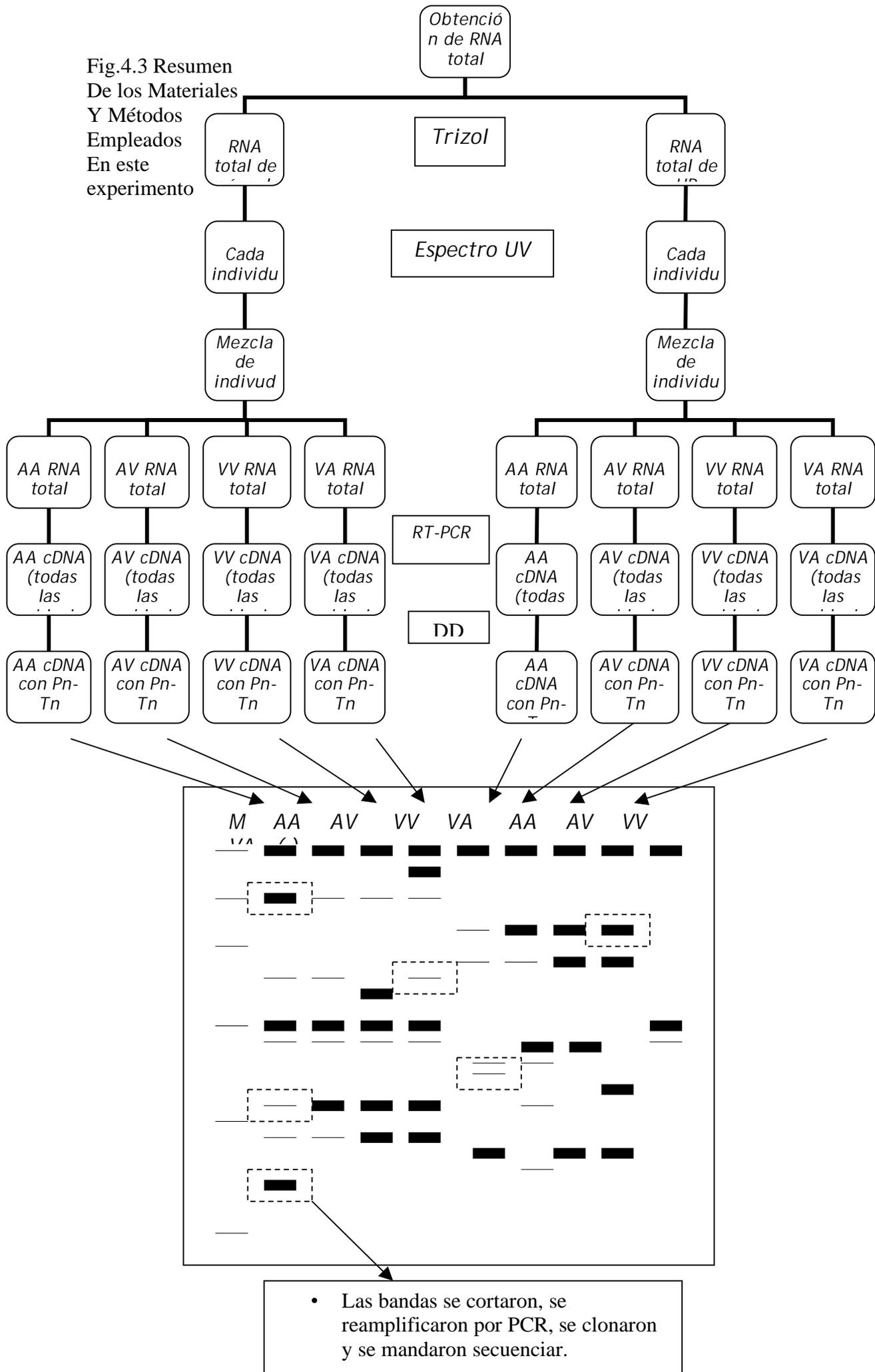
Figura 4.2. Mapa y puntos de referencia del vector de clonación pGEM® T-Easy

1.13 Análisis Bioinformático

Los fragmentos clonados fueron secuenciados por medio de la Degradación de Edman con un secuenciador automático por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias fueron analizadas en búsqueda de homología en el sitio Web del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) por medio de dos herramientas de la familia BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), que hacen una búsqueda en la base de datos del Gene Bank para obtener los valores de E y el porcentaje de homología. El blastn hace comparaciones entre las secuencias obtenidas y la base de datos, base a base, es decir compara secuencias de nucleótidos, y el blastx traduce en los seis marcos de lectura las secuencias a sus correspondientes aminoácidos y compara contra una base de datos no redundante del NCBI proteína a proteína identificando con mayor sensibilidad las de marcos de lectura más significativos.

La metodología utilizada fue sintetizada en un esquema para su visualización global. Ver figura 4.3

Fig.4.3 Resumen
De los Materiales
Y Métodos
Empleados
En este
experimento



1. RESULTADOS

1.1 Obtención de RNA

Se obtuvo el RNA total de cada camarón de un segmento de hepatopáncreas ($1,1454g \pm 0,99$) y otro de músculo ($0,4431g \pm 0,05$) por medio de la extracción con TRIZOL, se corroboró la viabilidad del RNA por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. En el músculo se definieron perfectamente las subunidades ribosomales 18S y 28S en dos bandas, Figura 5.1 con rango de intensidad de 1.5:1. En el HP la considerable cantidad de RNA no permitió en un primer intento observar éstas subunidades, Figura 5.2 por ello después de la cuantificación se hicieron diluciones hasta obtener la misma cantidad de RNA total por muestra.

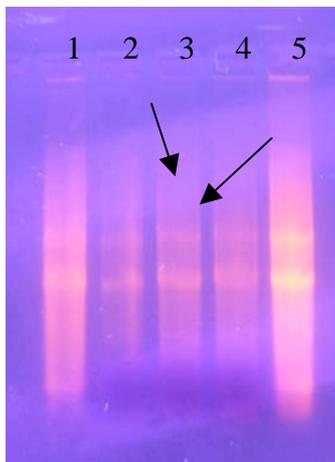


Fig. 5.1 Eficiencia de la extracción de RNA total por medio de la observación en un transiluminador de luz UV. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18S y 28S con una intensidad de 1:3, carriles del 1 al 5 RNA de músculo.

1.2 Cuantificación del RNA y preparación de *pooles*

Por medio de un espectrofotómetro de luz UV-Visible se tomaron lecturas a una absorbancia de 260 y 280 nm para cuantificar el RNA y deducir si había presencia de proteínas. Tomando en cuenta que 1 unidad A_{260} de ssRNA = $40\mu g/ml$ y la relación debe estar cercana a 2. Las concentraciones oscilaban entre $18,08\mu g/ml \pm 3,00$ para los HP y $1,23\mu g/ml \pm 0,29$ en el caso de los músculos. Se hicieron diluciones en los HP hasta obtener $1\mu g/ml$. La relación fue de $2 \pm 0,02$.

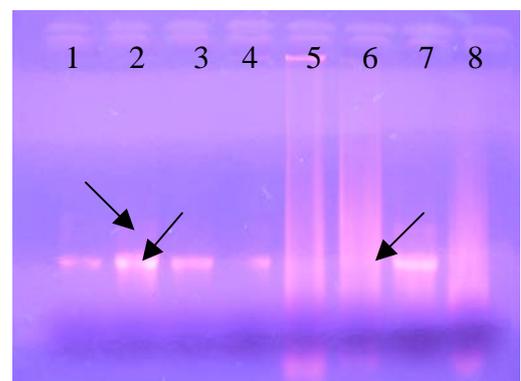


Fig 5.2. RNA total de los HP. En los carriles 1, 2, 3, 4 y 7

se realizaron diluciones, en los carriles 5 y 6 se observa el barrido de los HP por la considerable cantidad de RNA extraída.

1.3 Despliegue Diferencial en Hepatopáncreas

Se analizaron siete combinaciones de cuatro cebadores universales o aleatorios (cebador P) y cuatro cebadores de anclaje Oligo-[dT] (Cebador T) con Poli-T. Se generaron un total de 446 bandas, 63.71 bandas por pareja de cebadores. De las cuales 52 de 192 bandas se expresan diferencialmente en los *pools* correspondientes a muestras de individuos que han consumido primero proteína animal y luego trocado a proteína vegetal y 47 de 254 en camarones que consumieron primero proteína vegetal y después cambiado a proteína animal, lo que parece ser un efecto de la fuente de origen de la proteína en la expresión de determinados genes.

Se cortaron y reamplificaron por PCR el 33% de las bandas diferenciales entre los cuatro tratamientos. Ver Figura 5.3.

AA* AA* AV* AV* VV* VV* VA * VA*

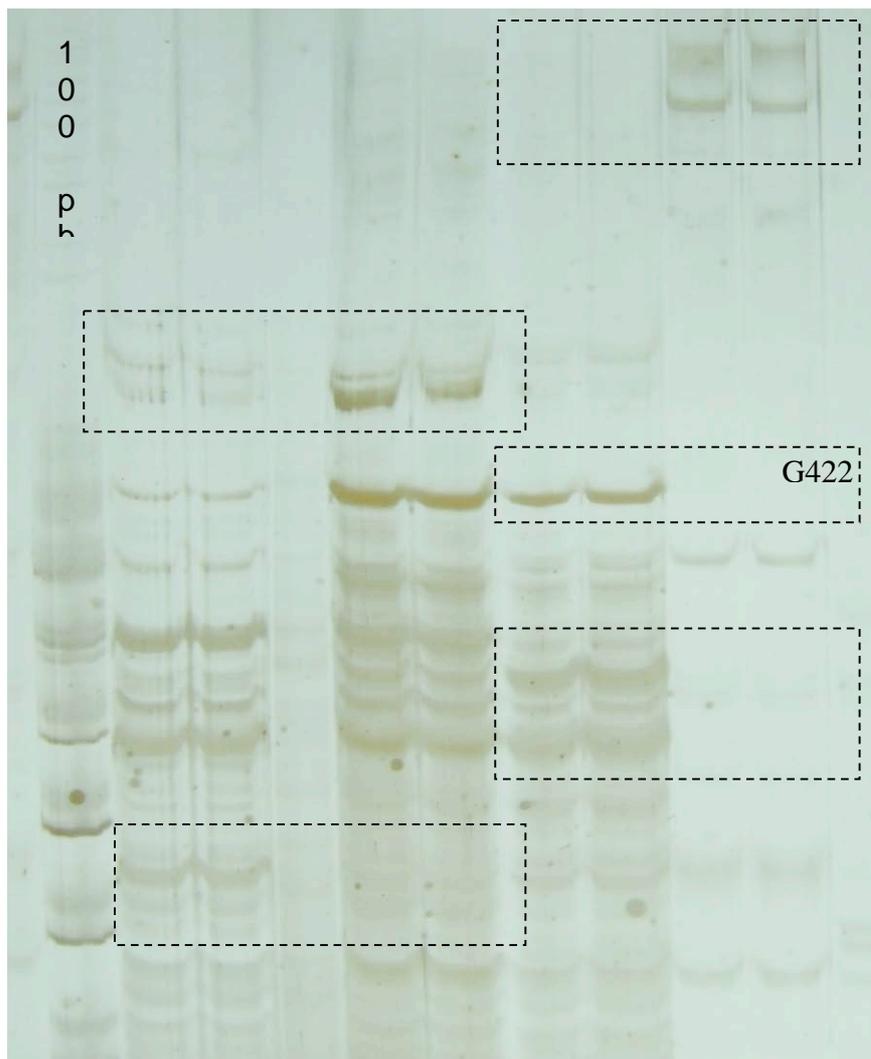


Fig 5.3 Expresión diferencial entre los diferentes tratamientos, las comparaciones se hicieron como se muestra en los recuadros, las bandas fueron escindidas para la reamplificación por PCR. Los asteriscos indican que se trata de *poles* de hepatopáncreas. Gel desnaturalizante de poliacrilamida-urea 7M por electroforesis a 70w 3:15 hrs teñido con AgNo₃

Se mandaron secuenciar el 45% de las bandas clonadas y se lograron obtener el 33% de las clonas (tabla 5.1)

Tabla 5.1 Bandas Resultantes del DD en Hepatopáncreas					
Juego de cebadores	Bandas Totales	Bandas diferenciales	Bandas reamplificadas	Bandas clonadas	Bandas secuenciadas
P1-T1	54	21	5	3	2
P3-T2	32	0	0	0	0
P3-T4	25	12	11	4	1
P3-T7	50	20	9	0	0
P5-T7	50	11	0	0	0
P6-T1	131	3	3	3	2
P6-T7	104	32	5	5	0
TOTAL	446	99	33	15	5

Tabla 5.1 Se analizaron en HP siete combinaciones de cuatro cebadores universales y cuatro cebadores de anclaje Oligo-[dT] con Poli-A obteniéndose los resultados presentados en esta tabla.

1.4 Despliegue Diferencial en Músculo

Se utilizaron en músculo, seis combinaciones de cuatro cebadores P y cuatro cebadores T. Se generaron un total de 460 bandas totales de las que sólo 160 se expresan diferencialmente. De éstas 61 de 234 se manifiestan con diferentes niveles de transcripción en el tratamiento de camarones alimentados primero con proteína animal y luego cambiados a proteína vegetal y 48 de 226 bandas revelan modificación en la tasa de transcritos de los camarones que consumieron primero proteína vegetal y después cambiado a proteína animal, lo que se entiende como un efecto de la fuente de origen de la proteína de la dieta en la expresión de determinados genes. Se cortaron y reamplificaron por PCR 33% de las bandas diferenciales totales, de éstas hebras se clonaron 39% en bacterias *E.coli* DH5 α y de las clonas mandadas a secuenciar se recibieron el 40% en secuencias (ver tabla 5.2) que fueron usadas como templatado para la comparación con otras secuencias de la base de datos del Gene Bank con el fin de encontrar a que gen corresponden.

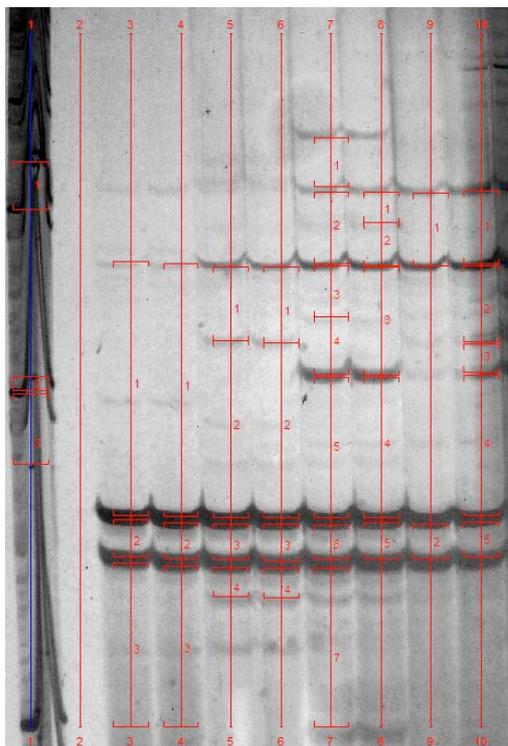
Juego de cebadores	Bandas Totales	Bandas diferenciales	Bandas reamplificadas	Bandas clonadas	Bandas secuenciadas
P1-T1	77	20	3	0	0
P3-T7	45	8	6	6	1
P5-T2	64	19	0	0	0
P5-T6	101	32	15	2	1
P6-T1	43	4	0	0	0
P5-T7	130	26	12	2	2
TOTAL	460	109	36	10	4

1.5 PAGE

El efecto de las dietas vegetales sobre los juveniles tempranos de *Litopenaeus vannamei* en la transcripción del mRNA se pudo observar (Figura 5.3) en geles de poliacrilamida-urea teñidos con AgNO₃ fotografiados con una cámara digital FinePix E900, transformadas por GIMP a .TIF y analizadas por Quantity One® Versión 4.2.3 haciendo comparaciones AA contra AV y VV contra VA, es decir comprando si el cambio de dieta provoca diferencias frente a camarones que

siempre comieron lo mismo y si estas diferencias están dadas por la fuente de origen de la proteína de la dieta.

Los resultados de los geles de poliacrilamida muestran diferencias en los patrones de bandeo de los camarones que sufrieron un cambio en su alimentación (AV y VA) con respecto a los que fueron alimentados siempre con la misma dieta (AA y VV). Se observan cDNA's de mRNA's que no cambian, se consideraron como constitutivos y otros fingerprints que se expresan diferencialmente bajo tres categorías: inducción, supresión, modificación en la tasa de transcripción (entendido como aumento o disminución). Se compararon los *pooles* de camarones a los que se les cambió la dieta en el tiempo 1 (36 días) que tuviesen una expresión diferencial en ambas réplicas con respecto al pool de camarones que se alimentaron siempre con la misma dieta para poder observar el efecto de la proteína dietética en la población de mRNA, entendiéndose la manifestación diferencial de la expresión como una de presencia-asusencia o como una intensidad variable de la banda entre los diferentes tratamientos, siendo coincidentes con su repetición, en todas las muestras de cada grupo



(Figura 5.4).

Figura 5.3 Detalle del Gel 8 del Despliegue Diferencial (DD) en muestras de hepatopáncreas (HP) de juveniles *Litopenaeus vannamei* de los tratamientos AA (carril 3 y 4), AV (carril 5 y 6), VV (carril 7 y 8), VA (carril 9 y 10), el carril 1 es el marcador de peso molecular de 100pb. Las líneas rojas horizontales muestran las bandas totales detectadas por el programa Quantity One ® 4.2.3 para DD.

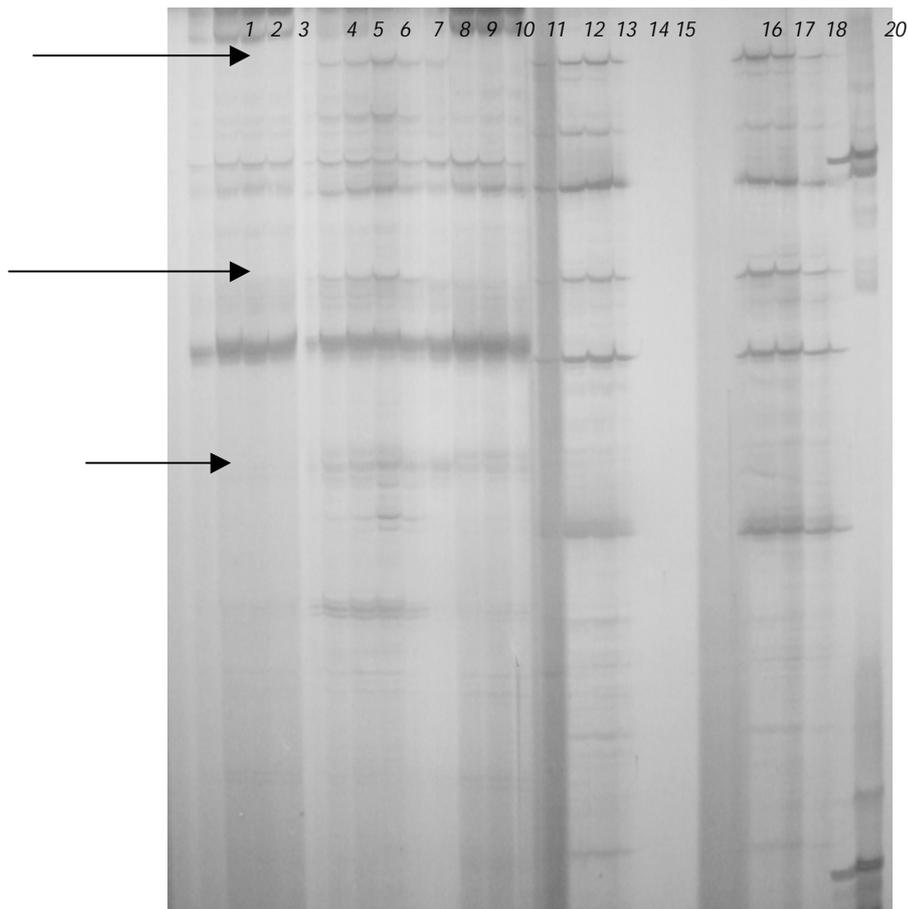


Fig 5.4 La modificación en los niveles de transcripción fue detectada por medio de la electroforesis de geles poliacrilamida teñidos con AgNO_3 , para ver las diferencias a nivel molecular ocasionados por los nutrientes de la dieta. Las muestras de músculo son del carril 1 al 12, las de HP del 13 al 20 en el orden AA, AV, VV y VA. Las flechas indican algunas de las bandas diferenciales, las más significativas.

1.6 Tabla de Secuencias

Se mandaron secuenciar 25 bandas corroboradas por digestión con enzimas de restricción, el secuenciador automático no encontró segmento en algunas, en otras se registró secuencia del vector. Los 10 archivos con inserto fueron limpiados alineando los extremos romos del vector hacia 3' y 5', y con los cebadores correspondientes. Una vez localizados se extrajo la secuencia limpia y se utilizó como templatado para buscar sus homólogos en el Blastn.

Se lograron obtener las series presentadas en la tabla 4.2. En la mayoría de los casos corresponden a un gen con función conocida, sin embargo también se obtuvieron secuencias que no están registradas en la base de datos.

ID	PPCH	Locus	Valor E	Homología	Tamaño pb
LV13	Quitinasa de <i>L. vannamei</i>	EU381118.1	7,00E-176	100%	542
LV1	Inhibidor de proteína STAT	DQ858917	6,00E-110	99%	433
Gabo3	Bacteria no cultivable	EF446186.1	3,00E-72	94%	277
G422	Quitinasa de RNAm	EU381118.1	5,00E-46	96%	115
G420*	Transposasa de <i>Listonella anguillarum</i>	CAL47051	3,00E-04	47.8	146
G5HAM	Proteína promotora Otg14	AF107591	4,00E-05	100%	56
G214AM	Promotor de Interferón	AF026945.1	9,00E-05	100%	59
G425	Miosina de cadena pesada	AF107585.1	3,00E-04	100%	115
GCBAM	Cinasa tipo I	AF107592.1	4,00E-04	100%	158
G243AM	No reportada en la base de datos				403

Tabla 5.2 Series obtenidas de la búsqueda con secuencias homólogas por el programa Blastn. PPCH, Probable proteína de combinación homóloga. * La secuencia G420 se analizó con Blastx con un store de 47.8 bits.

1.7 Análisis Bioinformático

Las bandas resultantes fueron alineadas con la secuencia completa de nucleótidos de la proteína probable de correspondencia por su homología para encontrar su semejanza a genes de los que posiblemente formen parte (cuando se conocen) y su función, el acceso de GeneBank está indicado en la columna de *Locus* de la tabla 5.2. En la tabla 5.3 se muestran las correspondencias con respecto a la expresión diferencial de las bandas tomadas de los PAG's.

ID	PPCH	Tejido	Dieta	ED	Primers
LV13	Quitinasa de <i>L. vannamei</i>	hp	VA	a	P1-T1
LV1	Inhibidor de proteína STAT	hp	AV	a	P1-T1
Gabo3	Bacteria no cultivable	hp	VA	p	fD1-rD1
G422	Quitinasa de RNAm	hp	VA	a	P6-T1
G420	Transposasa de <i>Listonella anguillarum</i>	hp	AV	i	P6-T1
G5HAM	Proteína promotora Otg14mRNA	hp	VA	i	P3-T4
G214AM	Promotor de Interferón	mm	VA	se	P5-T7
G425	Miosina de cadena pesada	mm	VA	se	P5-T6

GCBAM	Cinasa tipo I	mm	AV	se	P6-T7
G243AM	No reportada en la base de datos	mm	VA	i	P3-T7

Tabla 5.3 Lista de las secuencias reportadas en este trabajo indicando el tejido del que fueron obtenidos, el tratamiento, la expresión diferencial que presentaron y los primers con que se encontraron dichas secuencias del Despliegue Diferencial. Donde ed corresponde a expresión diferencial, hp, a hepatopáncreas, mm a músculo, i, inducido, a, ausente, se, sobreexpresado y p, presente.

La secuencia LV13 y G422 encontrados en el HP de camarones alimentados con proteína animal, no importando si la comiesen siempre, se modificara la dieta o no, son dos fragmentos correspondientes a un mismo gen de *L. vannamei* que pertenecen a dominios distintos ya que distan 449 kb del clon de referencia EU381118.1 para la Quitinasa encontrados con juegos de cabadores distintos: P1-T1 y P5-T7 respectivamente. En la figura 5.5 se puede observar el alineamiento de la secuencia completa del gen que codifica para la Quitinasa con respecto a las secuencias LV13 y G422 obtenidas experimentalmente a partir del tratamiento AA registrado como inducido para VA, los *pooles* de la dieta VV no presentaban esta banda.

La banda LV1 corresponde a una parte del gen que promueve la síntesis de una proteína reguladora de la transcripción fue encontrada con la combinación P1-T1 y su valor E es de 6E-110, se registra tomada de AA pero ausente con respecto a AV.

La banda G214AM corresponde a una secuencia intergénica de una región que codifica para una proteína promotora de Interferón: *cig64*, ésta proteína es un componente fundamental en la respuesta inmune y muy conservada en todas las especies el fragmento de 59 pares de bases fue obtenido de tejido muscular del pool de animales alimentados con el tratamiento VA registrado como sobreexpresado. La figura 5.6 corresponde a su alineamiento.

La secuencia G425 proveniente de tejido muscular con sus escasas 115 bases homologa al 100% con una parte del gen para la cadena pesada de la miosina, se reconoció como diferencial por sobreexpresión de VA contra VV y fue hallada con la combinación P5-T7.

La secuencia G5HAM corresponde a un fragmento de un mensajero *Otg14* encontrado por Despliegue Diferencial en HP de 422pb de las cuales se

obtuvieron 56pb que empalman al 100% en la secuencia reportada en el Gen Bank con el locus AF100328.

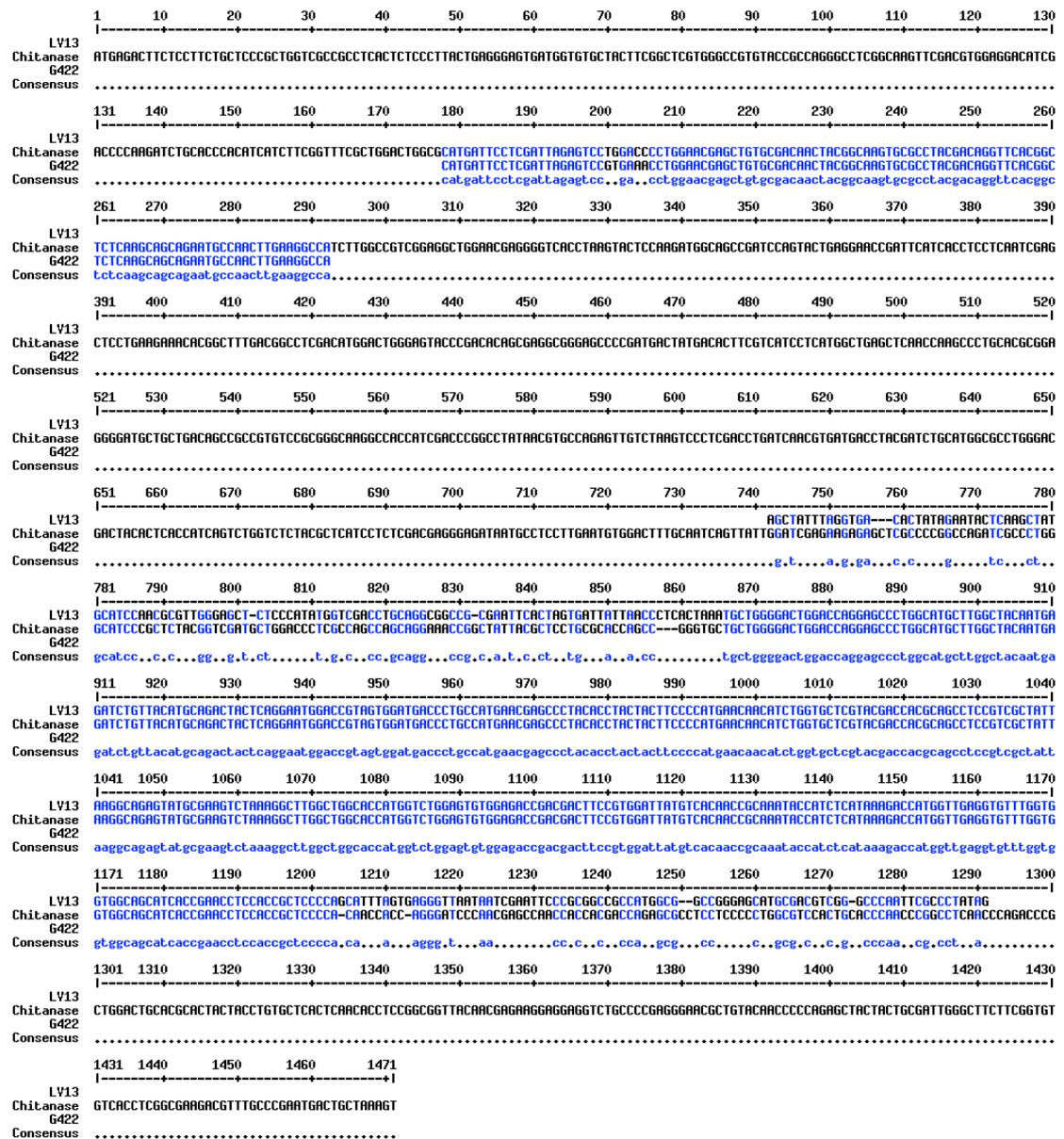


Figura 5.5 Alineamiento de la secuencia completa del gen de *L.vannamei* para la quitinasa con las secuencias LV13 y G422, Se observan las coincidencias de cada segmento con respecto al gen de referencia, sus tamaños, el sitio de homología y las regiones heterogéneas. Esta imagen fue obtenida con el programa *Multalin* de F. CORPET. (78)

La secuencia de la banda G420 obtenida del HP de juveniles alimentados con dieta vegetal, se analizó con la herramienta Blastx del NCBI en una base no-redundante de proteínas en sus seis posibles marcos de lectura y se encontró homología con una transposasa de *Listonella anguillarum*, con un score de 47.8 bits, un valor de E de 3e-04, una identidad del 100% y 0% de gaps. Por lo que se decidió dirigir la búsqueda por medio de cebadores *específicos* para eubacterias

con el fin de corroborar o descartar esa información. Producto de ésta búsqueda con los cebadores fD1-rD1 se halló la banda Gabo3. Se mandó secuenciar el producto del PCR con los cDNA's de los *pooles* de los HP obteniendo una banda visualizada en agarosa de 1600pb de los cuales se obtuvieron sólo 146pb, éstos homologan con el 16S ribosomal de una bacteria no cultivable.

La serie con identificación GCBAM parece ser parte de un gen que codifica para un segmento parcial del mRNA de cinasa I que tiene regiones conservadas.

Para la secuencia G243AM de 403 pb no se encontraron homólogos en la base de datos ni como secuencia de nucleótidos ni como sus seis posibles dominios traducidos en la base de proteínas.

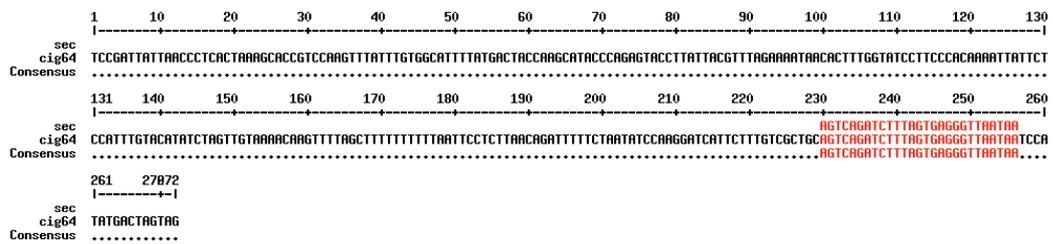


Fig 5.6 Alineamiento de la secuencia Cig64 con la secuencia G214AM encontrada en HP de camarones del tratamiento VA como sobreexpresada.

1. DISCUSIÓN

L. vannamei es la especie económicamente más importante de la acuicultura mexicana.¹⁰ Sin embargo, comparado con otros organismos acuáticos cultivados, se han realizado estudios concernientes a conocer el transcriptoma del camarón sobre todo en cuanto a su respuesta inmune frente a virus como el virus de la mancha blanca (WSV), Taura o algunos enfocados directamente a la búsqueda de un gen en particular,^{37, 79, 79-83} pero ninguno encontrado específicamente para conocer su respuesta hacia alimentos de origen vegetal. En el presente estudio se hizo un primer acercamiento de análisis global en hepatopáncreas que corresponde aproximadamente al 6.3% del transcriptoma y en músculo al 5.4%.

La comprensión de los mecanismos moleculares que se llevan a cabo en los procesos de adaptación al alimento es de vital importancia para el establecimiento de estrategias que permitan conocer la potencialidad del fenotipo para la formulación a futuro de dietas que provean de ventajas adaptativas al camarón como respuesta al alimento.

Los resultados obtenidos indican que hay una modificación en las poblaciones de mRNA entre los tratamientos, es decir que la expresión génica está siendo afectadas por la fuente de origen de la proteína de la dieta. Estos genes se pueden agrupar en ocho categorías de acuerdo a su función: 1. Genes relacionados con el metabolismo, 2. Genes encargados de la respuesta inmune, 3. Reguladores de la transcripción, 4. Genes que codifican para proteínas estructurales de músculo, 5. Genes reguladores de señalización celular, 7. Subunidades ribosomales y 8. No reportados.

Éstos resultados demuestran que la proteína de origen vegetal modifica la expresión genética en el hepatopáncreas y en el tejido muscular de los juveniles de *L. vannamei* y ha abierto la posibilidad de identificar marcadores moleculares para esa condición en el camarón blanco del pacífico o en otras especies.

El estudio de la regulación de la expresión genética debido a algún componente de la dieta ha sido estudiado fuertemente a partir del surgimiento del Proyecto Genoma Humano, y a raíz de esto se ha demostrado que los nutrientes tienen componentes bioactivos, estructurales y macromoléculas que interfieren con el material genético modificando los procesos de transcripción alterando el metabolismo por medio de la presentación de diferentes fenotipos.

En camarones existen diversos estudios de expresión diferencial enfocados a conocer la respuesta inmune del hospedero en branquias y hepatopáncreas como respuesta a la infección por diferentes antígenos a nivel de RNAm.^{85, 86} Por otro lado, Yu-Chi Wang *et al* en 2006, encontró diferencias en la distribución de los transcritos de Profenoloxidasa (PO) en distintos tejidos. La PO es una de las enzimas más importantes involucradas en la respuesta inmune innata.⁸⁷

Van Wormhoudt desde 1996 reportó cambios en la expresión diferencial de genes por medio de clonación molecular asociados al catabolismo de proteínas que codifican para las enzimas con mayor actividad digestiva, específicamente logró secuenciar los cDNAs en *L. vannamei* de la tripsina y quimotripsina, las más importantes endopeptidasas para los crustáceos.⁸⁸

Otros autores han demostrado que existen grandes diferencias en la expresión diferencial de los mRNA del HP bajo las diferentes condiciones del ciclo de muda.⁸⁹ Por su parte Muhlia Almazán *et al* en 2003, encontraron que la proteína de la dieta modula la actividad de las proteasas en el HP de *L. vannamei*, en su experimento probaron dietas con diferente porcentaje de proteína (15, 30 y 50%) y observaron cómo se modificaban los niveles de mRNA de tripsina y quimotripsina.⁹⁰

En otro experimento realizado con ratas se confirmó que los carbohidratos tienen la capacidad de aumentar la tasa de transcritos de genes involucrados en el metabolismo de lípidos.⁹¹

1.1 Proteínas relacionadas con el metabolismo

Al asignar una función a los transcritos encontrados, el análisis de similitud nucleótido a nucleótido identificó dos fragmentos (LV13 y G422) de pesos moleculares distintos con juegos de cebadores diferentes (P1-T1 y P6-T1) que corresponden al gen que codifica para la Quitinasa, una proteína de la familia de las hidrolasas de 480 aminoácidos codificados en dos regiones adyacentes que tiene la función de catalizar la hidrólisis del enlace α -1,4 glucosídico en la quitina, un polímero de N-acetil,D-glucosamina que se encuentra formando los exoesqueletos de los crustáceos y la pared celular de los hongos. La banda G422 se reportó como ausente en el tratamiento VA, y se observa en AA como un decremento en la tasa de transcripción. Ello permite concluir que los animales alimentados con la dieta vegetal están expresando el gen de la quitinasa debido a que intentan catabolizar los sustratos vegetales, y

los animales que sufrieron el cambio de dieta disminuyen las tasas de transcritos de este mensajero.^{92, 93}

1.2 Proteínas relacionadas con la respuesta inmune

La secuencia G214AM encontrada en músculo en el tratamiento VA reportada como diferencial por sobreexpresión, corresponde a un promotor de interferón (IFN). Los interferones son glicoproteínas de la familia de las citocinas comúnmente involucrados en mecanismos de defensa antiviral. Recientemente (2005) una proteína parecida al IF (IntLP, interferon-like proteín) homóloga del IFN α fue identificado por primera vez en crustáceos, en el camarón *Marsupenaeus japonicus*. El IntLP fue expresado sólo en camarones resistentes al WSSV pero no en los nativos y fue capaz de inducir un efecto antiviral en las células infectadas.^{83, 94, 95} Sin embargo hay una gran controversia acerca de la existencia de los IFN en invertebrados, publicaciones recientes por Rosa DR (2008) asegura que los IFN, y en general cualquier citocina no existen en invertebrados y que se confunden con porciones de secuencias de Fo-ATPsintasa mitocondriales.⁹⁶⁻⁹⁸

Los resultados de éste estudio sugieren que existe una relación entre el estado inmune y la respuesta del hospedero hacia diferentes antígenos, provocado por la proteína de la dieta.^{98, 99}

1.3 Reguladores de la transcripción

La proteína CDPC: recibe el nombre de “desplazamiento de CAAT” porque impide que la caja CAAT (un promotor) sea reconocida por sus proteínas específicas. La unión inespecífica de proteínas reguladoras es un problema importante en los organismos con genomas grandes. Para combatirla, los eucariotas han hecho que los genes tengan en torno a cinco dianas para proteínas reguladoras diferentes. Esta estrategia es útil para los activadores de la transcripción porque es una estrategia eficiente y ahorra esfuerzo. A esta

estrategia se le conoce como silenciamiento génico.⁹⁹ En este trabajo se encontró una secuencia que corresponde a un segmento del mensajero Otg14 que es una proteína inespecífica reguladora de la transcripción que se ha reportado para una orquídea (*Dendrobium Madame*) sometida a transición floral¹⁰⁰ y en un invertebrado que es el modelo de estudio para los artrópodos, la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en un estudio sobre las isoformas de un fotorreceptor¹⁰¹, por lo que será muy aventurado poder establecer una función de este regulador de la transcripción en este experimento.

1.4 Genes para proteínas estructurales

Algunos autores sostienen que la alimentación es el factor estratégico más usado en el control de calidad de la carne, ya que la influencia de la dieta en la composición del músculo ha sido claramente establecida desde hace muchos años.⁸⁴

Así se explica como el transcrito variante C del mRNA correspondiente a la cadena pesada CG17927-RC de la miosina para *Drosophila melanogaster* mostró similitud en la secuencia nucleótido nucleótido en el blastn y su correspondiente a proteína para uno de los seis dominios en el blastx con la secuencia G425 hallada como sobreexpresada para el tratamiento VA modifica la regulación de dicho gen pues está siendo afectada por la proteína de la dieta.¹⁰²

Andersen (2005) encontró que cambios metabólicos causados por la depleción de vitamina E en cerdos, llega a inhabilitar la proteína cinasa I con lo cual se inhibe la catálisis de la fosforilación y se inactiva la glicógeno sintasa, limitando así la síntesis de glucógeno.⁸⁴ La adenil ciclasa es la enzima responsable de sintetizar el AMP cíclico localizada mayormente en las membranas celulares, donde la vitamina E juega un rol muy importante. Aunque este mecanismo es debatido por otros autores no han encontrado otra explicación a los altos y mantenidos requerimientos de Vitamina E para el metabolismo del glucógeno asociado a la calidad de la carne. El glucógeno es el elemento más importante para favorecer las características organolépticas y la composición química y física, pues es el responsable de convertir el músculo en carne por medio de su fermentación anaeróbica en ácido láctico.^{103, 104} En las dietas el cocktail vegetal contiene alga espirulina que es un alimento rico en vitamina E, por lo que se

sugiere que pueda ser este factor el determinante que esté provocando la expresión diferencial a nivel de mensajeros en el músculo sobre la secuencia de GCBAM que se identificó como una cinasa I.

1.5 Subunidades de RNA ribosomal

En el hepatopáncreas se han reportado asociaciones simbióticas entre bacterias que componen la microflora y siete especies de camarón. Debido a sus hábitos bentónicos, a los cambios en su alimentación por la modificación del tracto digestivo en cada estadio de su desarrollo (trofodinámico) y a su dieta en parte detritívora, no se puede perder de vista la importancia que tiene la actividad de la microflora en el hepatopáncreas. En este experimento se encontraron secuencias inducidas de bacterias en los camarones que sufrieron cambio de dieta animal a vegetal (AV) con los primers del DD que corresponden a la transposasa IS630 de *Listonella anguillarum* serovariedad O2, una gamaprotobacteria de la familia de los vibrio, encontrada comúnmente en monitoreos bacteriológicos del agua en los estanques de engorda y residente del tracto digestivo que potencialmente puede provocar manifestaciones clínicas en camarones, sobre todo en cultivos de flock y en sistemas intensivos con altas densidades de siembra. Se decidió realizar una búsqueda dirigida para conocer esa parte del genoma exógeno del camarón. Resultado de este experimento, se hayaron cuatro bandas de 1600pb de las que se logró secuenciar una que corresponde a la subunidad 16S de una bacteria no cultivable por medio del Blastx.^{105, 106}

1.6 N/A

No se encontraron homólogos en la base de datos, ni por nucléotidos ni en su transcrito a estructura primaria en ninguno de los seis marcos de lectura, debido a que no se conoce por completo ni el genoma ni el transcriptoma del camarón por lo que se sugiere que éstas secuencias que vienen de mRNA maduros sean pedazos de un mensajero que se está manifestado en el músculo debido al cambio de dietas de vegetal a animal (VA).

1. CONCLUSIÓN

En este estudio, el Despliegue Diferencial en *L. vannamei* alimentados con diferente fuente de origen de la proteína, permitió la detección de genes que se reprimen, inducen o modifican sus niveles de expresión como respuesta a esa variación en el alimento.

Estos resultados demuestran que el origen de la proteína de incluida en la dieta modifica la expresión genética en el hepatopáncreas y en el tejido muscular de los juveniles de *L. vannamei* y ha abierto la posibilidad de identificar marcadores moleculares para esa condición en el camarón blanco, o en otras especies.

Las secuencias no encontradas en las bases de datos del NCBI, abren nuevas líneas de investigación en las que pueden utilizarse para escrutar bancos de cDNA y monitorear niveles de transcritos mediante Northern blot o ensayos de protección a nucleasa.

Este experimento es un preámbulo que muestra un panorama general de cómo la proteína de la dieta modifica la estructura molecular de los camarones en diferentes rubros. Se deben realizar estudios complementarios para conocer cada uno de éstos y probarlos por PCR tiempo real o hibridación y entonces poder modificar con seguridad la dieta de esta especie y mejorar el rendimiento de la producción, la eficiencia de la empresa y la calidad de la carne.

REFERENCIAS

1. SAGARPA (2008). Pesca y acuicultura sustentables. *Instituto Nacional de Pesca*.
2. Estévez D (2007). Entrevista con el secretario de Hacienda, Agustín Cartens. *Poder y Negocios*.
3. Chomsky N (2007). Soberanía alimentaria en el Foro Social Mundial. *VII Foro Social Mundial*.
4. Rothlisberg CP (1998). Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. *Aquaculture* **164**, 49-65.
5. FAO (2006). Fisheries Technical Paper. No. 500. *State of world aquaculture 2006* **500**, 56.
6. FAO (2002). Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2002. *Department of fisheries Part I*.
7. SAGARPA (2008). Plan de Manejo para la Pesquería de Camarón en el Litoral del Océano Pacífico Mexicano. *Instituto Nacional de Pesca* 6-76.
8. SAGARPA (2008). Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
9. INEGI (2008). Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
10. SEMARNAT (2005). Anuario Estadístico de Pesca. *Sistema Nacional de Información Ambiental y Recursos Naturales*.
11. Parra U (1992). Resultado preliminares sobre los requerimientos proteicos de juveniles de camarón blanco (*Penaeus schmitti*, Burkenroad) en acuarios experimentales. *Zootecnia Tropical* **10**, 189-203.
12. Kanazawa A (1989). Protein requirements of Penaeid shrimp. *Advances in tropical Aquaculture* **9**, 261-270.
13. Cruz Suárez LE, Antimo-Pérez SJ, Luna-Mendoza N, Tapia-Salazar M, Guajardo-Barbosa C & Ricque-Marie Denis (2000). Relaciones proteína/energía y proteína vegetal/animal optimas en alimentos de engorda para *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*.

14. Pascual C, Zenteno E, Cuzon G, Sánchez A, Gaxiola G & Taboada G (2004). *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture* **236**, 431-450.
15. Gaxiola G, Abelardo B, Maldonado C, Jiménez-Yang L, Guzmán E & Arena L (2006). Nutrición y Domesticación de *Litopenaeus vannamei*. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.* **15**, 139-162.
16. Siccardi III AJ, Lawrence AL, Gatlin III DM, Fox JM, Castille FL, Pérez-Vázquez M & Abelardo B (2006). Requerimientos de energía y proteína digerible para crecimiento y mantenimiento de subadultos de *Litopenaeus vannamei*. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.* **15**, 238-281.
17. Nasir K & Allen D (2003). Metabolic Requirement for proteina by pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Panorama Acuícola Magazine* **8**, 35-36.
18. NCBI (2008). Taxonomy Browser. *National Center for Biotechnology Information*.
19. Departamento de Pesca (2008). Manual para la cría de camarones peneidos.
20. FAO (8 A.D.). Consultoría en maduración de camarones peneidos (*P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. schmitti*): Informe Técnico. *Depósito de Documentos de la FAO*.
21. Echeverría F, Otero V, Cornejo F & Rodríguez J (2002). WSSV y ciclo de muda en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *El Mundo Acuícola* **8**, 43-47.
22. Drach P (1939). Mue et cycle t'intermue chez les crustacés décapodes. *Annales de l'Institut Oceanographique* **19**, 103-391.
23. Vega-Villasante F, Nolasco-Soria H, Civera-Cerecedo R, González-Valdéz R & Oliva-Suárez M (2000). Alternativa para la alimentación del camarón en el cultivo: el manejo de la muda. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.* 313-320.
24. Forrellat A & Gaxiola G (2003). Digestión, absorción y utilización de nutrientes. In *Enzimas Digestivas y Control de la Digestión*, pp. 27-60.

25. McTigue AN & Zimmerman JR (1991). Carnivory vs. herbivory in juvenile *Penaeus setiferus* (Linnaeus) and *Penaeus aztecus* (Ives). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **151**, 1-16.
26. Rosas C, Brito R, Sánchez A & Gaxiola G (2003). Bioenergética de crustaceos decápodos con énfasis en camarones peneidos. *I Jornadas Iberoamericanas de Nutricion en Acuicultura. Avances de la Nutrición de Camarones Peneidos: hacia la optimización de aliementos y estrategias de alimentación para una camaronicultura sustentable.*, 1-30.
27. Kureshy N & Allen D (2003). Metabolic requeriment for protein by pacific white shrimp, *L. vannamei*. *Aquaculture* **8**, 36-37.
28. Rosas C, Brito R, Sánchez A & Gaxiola G (2003). Bioenergética de crustaceos decápodos con énfasis en camarones peneidos. *I Jornadas Iberoamericanas de Nutricion en Acuicultura. Avances de la Nutrición de Camarones Peneidos: hacia la optimización de aliementos y estrategias de alimentación para una camaronicultura sustentable.*, 1-30.
29. SERMARNAP (1996). NOM-001-ECOL-1996. *Norma Oficial Mexicana*.
30. Alonso-Lopez N (2001). Nuevas estrategias para la administracion de los recursos humanos en la camaronicultura cubana. *Tesis de Licenciatura para obtener el título de Licenciado en administración de empresas. Facultad de Contaduría y Administración.*
31. Perez-Arvizu ML (2006). Situación Actual de la camaronicultura en México. *Tesis de Licenciatura para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista*.
32. Kanazawa A (1989). Protein requirements of Penaeid shrimp. *Advances in tropical Aquaculture* **9**, 261-270.
33. Cuzon G, Lawrence AL, Gaxiola G, Rosas C & Guillaume J (2004). Nutriton of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* **235**, 513-551.
34. Fernández-Gimenez AV, Garcia-Carreño FL, Navarrete-DelToro NA & Fenucci JL (2001). Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **130**, 331-338.
35. García T, Gaxiola G, Garcia T, Pedroza R, Soto L, Lopez N & Rosas C (1998). Influencia de las proteínas dietéticas sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el rendimiento de las postlarvas del camaron blanco (*Penaeus setiferus*) y del camaron rosado (*P. duorarum*) del golfo de

36. Mosha TC, Gaga HE, Pace RD, Laswai HS & Mtebe K (1995). Effect of blanching on the content of antinutritional factor in selected vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition* **47**, 361-367.
37. García-Gómez Y & Arena OL (2005). Evaluación de la expresión fenotípica de la enzima digestiva α -amilasa de juveniles y preadultos de Camarón Blanco del Golfo (*Litopenaeus setiferus*) alimentados con diferentes porcentajes de proteínas y carbohidratos.
38. Hernández-Sucedo D & Arena OL (2005). Evaluación genotípica de la α -amilasa ante diferentes dietas con distintas concentraciones de carbohidratos en Camarón Blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). *Tesis de Licenciatura para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*.
39. Casillas-Hernández R, Magallón F, Portillo G, Carrillo O, Nolasco H & Vega-Villasante F (2002). La actividad de proteasa, amilasa y lipasa durante los estadios de muda del camarón azul *Litopenaeus stylirostris*. *Revista de Investigaciones Marinas* **23**, 35-40.
40. Cuartas IE, Díaz CA & Petriella MA (2002). Estudio morfológico e histológico del Hapatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (bate) (Crustacea, Penaeoidea). *Revista de Investigaciones de Desarrollo Pesquero* **5**, 5-13.
41. Kanazawa A (1989). Protein requirements of Penaeid shrimp. *Advances in tropical Aquaculture* **9**, 261-270.
42. Montemayor-Leal J, Mendoza-Alfaro R, Aguilera-González C & Rodríguez-Almaraz G (2005). Moléculas sintéticas y extractos animales y vegetales como atrayentes alimenticios para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Revista AquaTIC* **22**, 1-10.
43. Gill RG, Pop M, DeBoy T, Eckbur B, Turnbaugh J, Samuel B, Gordon J, Relman D, Fraser-Liggett C & Nelson K (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**, 1355-1359.
44. Hooppens VL, Stappenbeck ST, Hong VC & Gordon IJ (2003). Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology* **4**, 269-273.
45. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO & Kasper DL (2005). An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* **122**, 107-118.

46. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzeneh F, Edberg S & Medzhitov R (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell* **118**, 229-241.
47. Turnbaugh J, Backhed F, Fulton L & Gordon J (2008). Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe* **3**, 213-223.
48. Oh J, Backhed F, Giannakis M, Engstrand L & Gordon J (2006). Interactions between gastric epithelial stem cells and *Helicobacter pylori* in the setting of chronic atrophic gastritis. *Current Opinion Microbiology* **9**, 21-27.
49. Moriarty DJW (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* **151**, 333-349.
50. Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D & Múzquiz JL (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* **114**, 173-186.
51. Moriarty DJW (1990). Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutrition role of the gut flora. *Microbiology in Poecilotheims*. 217-222.
52. Gullian M, Thompson F & Rodríguez J (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **233**, 1-14.
53. Mutch MD, Wahli W & Williamson G (2005). Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *The FASEB Journal* **19**, 1602-1614.
54. Pérez E (2005). Genómica nutricional. *Endocrinología y Nutrición* **13**, 190-196.
55. Gillies JP & Faha PD (2003). Nutrigenomics: The Rubicon of molecular nutrition. *Journal of the American Dietetic Association* **103**, s50-s55.
56. Gómez AA (2007). Nutrigenómica y Nutrigenética. *Ámbito Farmacéutico, Nutrición* **25**, 78-86.
57. Ferguson RL, Shelling NA, Lauren D, Heyes AJ & McNabb CW (2007). Nutrigenomics and gut health. *Mutation Research* **622**, 1-6.
58. Paoloni-Giacobino A, Grimble R & Pichard C (2003). Genetics and Nutrition. *Clinical Nutrition* **0**, 00.

59. Bonneau M & Laarveld B (1999). Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livestock Production Science* **59**, 223-241.
60. Cagigas RA, Ferreira CR & Tam HM (2002). Biología molecular y nutrición. *Revista Cubana de Aliment Nutr* **16**, 69-76.
61. Grotz N & Guerinot ML (2002). Limiting nutrients: an old problem with new solutions? *Plant Biotechnology* **5**, 163.
62. Vieites JM, Sánchez-Pozo A, Gil A & Suárez A (2005). Desarrollo de un protocolo de análisis de la expresión génica mediante "Differential Display" que reduce el número de falsos positivos. *Ars Pharm* **46**, 193-204.
63. Alberts B, Wilson J & Hunt T (2008). *Molecular Biology of the cell*, pp. 360-425, New York, USA.
64. Harper HA (1984). *Bioquímica de Harper*.
65. Jeremy M, Berg J, Jhon L, Tymczco & Lubert Stryer (2006). *Biochemistry*. New York, New York.
66. Stein J & Liang P (2002). Differential Display technology: a general guide. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1235-1240.
67. Mikhail VM, Sergey A & Lukyanov SA (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Research* **26**, 5537-5543.
68. Mullis KB, Faloona FA, Scharf F & Saiki R (1985). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase catalyzed Chain Reaction. *Science* **230**, 1350.
69. Santamaria-Damian S (2008). Efecto de la conversión de dietas enriquecidas con proteína de origen animal y vegetal en el balance bioenergético en juveniles tempranos de *Litopenaeus vannamei*.
70. Monroy E (2008). Expresión diferencial de la tripsina en poslarvas de *Litopenaeus vannamei* alimentados con fuentes convencionales y alternativas de proteína.
71. Yañez J (2008). Cuantificación del RNA.
72. Sambrook & Russell (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* New York, USA.

73. Liang P, Averboukh L & Pardee BA (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research* **21**, 3269-3275.
74. Brant JB, Caetano-Anollés G & Gresshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **196**, 80-83.
75. Maxam AM & Walter G (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical clavages methods in enzymology. *Methods in Enzymology* **65**, 499-560.
76. Brown JD (1997). A rapid, non-toxic protocol for sequence-ready plasmid DNA.
77. Lakshmi R (1998). Extraction of superior-quality plasmid DNA by a combination of modified alkaline lysis and silica matrix. *Analytical Biochemistry* **272**, 112-115.
78. Corpet F (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**, 10881-10890.
79. Jian-Horng L, Chin-Chin C, Jin-Lu W, Chun-Wei H, Hirono I, Takashi A, Hsueh-Fen J, Chu-Fang L, Guang-Hsiung K & Hsuan-Chen H (2007). Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics* **8**, 120.
80. Luo T, Zhang X, Shao Z & Xu X (2003). *PmAV*, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters* **551**, 53-57.
81. Lu Y, Wang SY & Lotz MJ (2004). The use of differential display to isolate viral genomic sequence. *Journal of Virological Methods* **121**, 107-114.
82. Seiliez I, Panserat S, Kaushik S & Bergot P (2001). Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Δ 6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **130**, 93.
83. Dhar AK, Dettori A, Roux MM, Klimperl KR & Read B (2003). Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays. *Archives of Virology* **148**, 2381-2396.
84. Andersen H, Oksbjerg N, Young J & Therkildsen M (2005). Feeding and meat quality - a future approach. *Meat Science* **70**, 543-554.

85. Yepiz-Plascencia G (2005). *Aquaculture*.
86. Corthésy-Theulaz I, Dunnen P, Ferré G, Müller M, Van-Belzen N & Van-Ommen B (2005). Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Annals of Nutrition and Metabolism* **49**, 355-365.
87. Yu-Chi W, Poh-Shing C & Houng-Yung Chen (2006). Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 414-418.
88. Klein B, Le-Moullac G, Sellos D & Van-Wormhoudt (1996). Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Internationa Journal of Biochemistry Cell Biology* **28**, 551-563.
89. Sánchez-Paz JA, García-Carreño F, Muhlia-Almazán A, Hernández-Saavedra NY & Yepiz-Plascencia G (2003). Differential expresion of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvaton conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **292**, 1-17.
90. Muhlia-Almazán A, García-Carreño F, Sánchez-Paz JA, Yepiz-Plascencia G & Peregrino-Uriarte AB (2003). Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin en the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **135**, 373-383.
91. Ye-Bi H, Zhang W & Shi-Ying X (2008). Corn bran dietary fibre modified by xylanase improve the mRNA expression of genes involved in lipids metabolism in rats. *Food Chemistry* **109**, 499-505.
92. Flach J, Pilet PE & Jollès P (1992). What's new in chitinase research? *Experientia* **48**, 701-716.
93. Molina-Poveda C, Escobar V & Gamboa J (2002). Estrategia de Alimentación de Acuerdo a la Demanda Fisiológica del Juvenil *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún. QuintanaRoo.*
94. He N, Quin Q & Xu X (2005). Differential profile of genes expressed in hemocytes of White spot syndrome virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression substractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Research* **66**, 39-45.
95. Clavero-Salas A, Sotelo-Mundo RR, Gollas-Galván T, Hernández-López J, Peregrino-Uriarte AB, Muhlia-Almazán A & Yepiz-Plascencia G (2007). Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus. *Fish and Shellfish*

96. Robalino J, Almeida JS, McKillen D, Colglazier J, Trent HF, Chen YA, Peck M, Browdy CL, Chapman RW, Warr GW & Gross PS (2006). Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiology Genomics* **29**, 44-56.
97. Rosa MD & Barraco MA (2007). Does interferon really exist in shrimp?
98. Rosa MD & Barraco MA (2008). Shrimp interferon is rather a portion of the mitochondrial Fo-ATP synthase than a true alpha-interferon. *Molecular Immunology* **45**, 3490-3493.
99. Zhu H, Jiang-Ping C & Shenk T (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs. Induction of interferon-responsive RNAs. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **94**, 13985-13990.
100. Yu H & Goh CJ (2000). Identification and Characterization of Three Orchid MADS-Box Genes of the AP1/AGL9 Subfamily during Floral Transition. *Plant Physiology* **123**, 1325-1336.
101. Begeman G, Michon AM, Voorn L, Wepf R & Mlodzik M (1995). The Drosophila orphan nuclear receptor seven-up requires the Ras pathway for its function in photoreceptor determination. *Development* **121**, 225-235.
102. Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, Acevedo D, Evans-Holm M, Frise E, Wan K, Park S, Mendez-Lago M, Rossi F, Villasante A, Dimitri P & Karpen GH (2007). Sequence Finishing and Mapping of Drosophila melanogaster Heterochromatin. *Science* **316**, 1625-1628.
103. Mahoney CW & Azzi A (1998). Vitamin E inhibits protein kinase C activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **154**, 694-697.
104. Srivastava US, Robin L & Thakur ML (1992). Turnover of cyclic adenosine 5-monophosphate is elevated in skeletal muscle of vitamin E-deficient rabbits. *Journal of Nutrition* **122**, 1935-1941.
105. Gullian M, Thompson F & Rodríguez J (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **233**, 1-14.
106. Rothlisberg PC (1988). Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. *Aquaculture* **164**, 49-65.