

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias

**Efecto de las proteínas de origen animal y vegetal de la dieta en el  
fenotipo de la tripsina del camarón blanco del Pacífico, Litopenaeus  
vannamei**

Alumna:  
Elis Monroy García

Directora de tesis:  
Dra. María Leticia Arena Ortiz  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Autónoma de México



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.

## Agradecimientos

A mi papá y mi mamá, por llenarme de amor, por apoyarme incondicionalmente en las buenas y en las malas, por nunca dejarme caer, por creer en mí y por hacer mi vida tan bonita.

A Marimar, mi pilar incondicional y a Nat, la estrellita que le da brillo a mis días, por ser lo mas preciado y hermoso que tengo, por ser mis amigas, cómplices e imprescindibles hermanas.

A Vicky, mi alma gemela, sin importar jamás el tiempo y la distancia.

A Felipe, mi hilo, por el pan y la cebolla, por lo fuerte del Olimpo, por compartirme tu camino y las estrellas de tu azotea.

A mi abuelo Boni, por todo su cariño y generosidad, a mi abue Lolis, por estar siempre presente, a mi abuela Nena por haber sido siempre tan consentidora con todos los detalles que la hacen única, y al abuelo Carlos, por haberme dado a mi papá.

A Ale, por ser una amiga tan verdadera, y por todo el cariño y la paciencia que me has tenido, y junto con Pedro y Kirikú haberme adoptado en su pequeña familia desde el primer momento.

A Leticia Arena, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis, y por el apoyo que siempre me dio para concluirla, y por todas las enseñanzas que surgieron en el camino.

A Gaby Gax, por ser mi ejemplo, maestra y amiga, y por estar conmigo al pie del cañón en las buenas y en las malas.

A mi partner Maldonado y a Emilio (el mas maravilloso *vannamei*) por haberme enseñado y ayudado durante todo el proceso de la tesis, pero principalmente por su invaluable amistad.

A toda la banda de Sisal , en todas sus distintas facetas: A Jorge Arturo (por lo lindo que fue haber vivido esa etapa juntos), Quetza-dilla (la mas preciosa de las guerreras), Nadia (mi portuguesa favorita), Chela, Shagy, Cat, Oscar, Man, Sarita, Sofi, Cholo, Lenin, Jazz, Richard, Liliana, y por supuesto la pequeña Maya, a toda la familia Hernández, Ana, Gaby, Monir y Karin, Andres, Chiva, Pana y todos los que hicieron que Sisal fuera tan buena experiencia.

A todos los investigadores, técnicos y trabajadores de la UMDI. De manera muy especial a Carlos Rosas y Maite Mascaró, no solo por lo importante de sus contribuciones a mi tesis, sino por haber sido tan buenas personas conmigo. A Xavier, Bere, Carmen, Ariadna, Marco, Vianey, Josué, Arévalo, Tyson, Eric, Janet, Don Rafa y Don Andrés por haber hecho mucho mas agradable la estancia en la UMDI.

A Ainara, por ser la mejor chiqui del mundo, por todas las horas de risas que vivimos juntas y por ser mi gran amiga y a Agustín, por ser el mejor rati que nunca me hubiera

imaginado, por todas las explicaciones que me diste durante toda la carrera, todos los buenos ratos y tu maravillosa amistad.

A toda la banda de la fac, quienes hicieron que la universidad sea una de las etapas mas lindas en mi memoria. En especial a Salvador, por todo lo que hemos aprendido y crecido juntos, a Juanpi, Haven, Vla, Gaby, Bob, Eliud, Abril, Delfín, Ale Mena, Omar, Anaid, Xochitl, Mariana, Chester, Pie, Tania, Bianca, Nadia y a todos los que se me escapan en este momento.

A toda mi gigantesca y hermosísima familia.

A mi gordo, porque lo mas importante es que aquí seguimos y a toda la gozadera, en especial a Daniel, por hacer feliz a mi hermana.

A Carlos, Monica, Jhonatan y Fernando, porque aunque cada uno en su camino, nos seguimos trayendo como piedritas en los zapatos.

A Petibú, mi amigo mas viejo y uno de los mejores versos de mi vida, a Carita de perro porque se que nos queremos tanto que siempre vamos a estar para el otro, a Moye porque juntos somos una piedra y a la flaka, porque siempre ha sido mi amiga.

El presente trabajo se realizó en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de la Facultad de Ciencias, UNAM, en Puerto Sisal, Yucatán, bajo la dirección de la Dra. María Leticia Arena Ortiz, con el financiamiento de los proyectos Papiit IN216406-4 y CONACYT 49406, y con una beca otorgada por el proyecto Papiit IN216406-4

.

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

- a) Manejo de los reproductores y obtención de los nauplios: Ing. Miguel Arévalo
- b) Cria de las larvas de camarón: Ing Adriana Paredes
- c) Producción del alimento vivo para las larvas de camarón: Biol. Gabriela Palomino
- d) Elaboración de los alimentos balanceados para los reproductores y las postlarvas: Biol. Gabriel Taboada.
- e) Asesoría en técnicas de biología molecular: Dr. Gabriel Lizama

## Hoja de Datos del Jurado

1.- Datos del Alumno

Monroy

García

Elis

52731730

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

099208062

2.- Datos del Tutor

Dra.

María Leticia

Arena

Ortiz

3.- Datos del Sinodal 1

Dr.

Manuel

Miranda

Anaya

4.- Datos del Sinodal 2

Dra.

Martha Gabriela

Gaxiola

Cortés

5.- Datos del Sinodal 3

M. en I. B. B.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevsky

6.- Datos del Sinodal 4

M. en C.

Juan Carlos

Maldonado

Flores

7.- Datos del Trabajo Escrito

Efecto de las proteínas de origen animal y vegetal de la dieta en el fenotipo de la tripsina del camarón blanco del Pacífico, Litopenaeus vannamei.

47 p

2008

# Índice

## **1. Introducción**

## **2. Objetivos**

## **3. Hipótesis**

## **4. Metodología**

### 4.1 Material biológico

#### 4.1.1 Origen de los organismos

### 4.2 Diseño y dispositivo experimental y composición de dietas

### 4.3 Obtención de las muestras

#### 4.3.1 Preparación de las muestras

### 4.4 Actividad enzimática de la tripsina

### 4.5 Electroforesis

#### 4.5.1 Preparación de las muestras para la corrida de electroforesis

#### 4.5.2 Preparación del marcador

#### 4.5.3 Corrida de las muestras

#### 4.5.4 Revelado del gel

### 4.6 Análisis estadístico de los resultados

## **5. Resultados**

### 5.1 Supervivencia

### 5.2 Crecimiento

5.3 Actividad enzimática

5.4 Isoformas de tripsina

## **6. Discusión**

6.1 Zootecnia

6.2 Actividad enzimática

6.3 Características de las proteínas vegetales

6.4 Evaluación fenotípica de la tripsina

## **7. Conclusiones**

## **8. Bibliografía**

## **Anexo**



## 1. Introducción

En las últimas décadas se han alcanzado avances en la comprensión de los mecanismos mediante los cuales las células y los organismos son capaces de responder a los factores ambientales a los que se enfrentan día a día (S.E.P., 2005). Esto ha posibilitado la oportunidad de conocer los efectos que estos factores representan en el aprovechamiento de especies de interés para el consumo humano.

Para comprender el funcionamiento en que se basan dichos mecanismos es necesario ubicarse en un contexto celular, en donde toda la información que se requiere para llevar a cabo cualquier función se encuentra codificada en el lenguaje universal de las secuencias del ADN (Ácido desoxirribonucleico). Las unidades funcionales del ADN son los genes, los cuales son segmentos que pueden codificar una proteína. Los genes presentan formas variantes, denominadas alelos, que son los responsables de las variaciones en las características hereditarias. Para que la expresión de un gen se lleve a cabo, es necesario que se transcriba en una secuencia de ácido ribonucleico mensajero (mARN), la cual es una molécula menos estable que sale del núcleo y es traducida mediante el código genético en una secuencia de aminoácidos, los cuales formarán una proteína. Las proteínas cumplen muchas funciones distintas a nivel celular. Pueden ser proteínas estructurales, contribuyendo a las propiedades físicas; enzimas, que catalizan reacciones químicas; anticuerpos, que constituyen nuestro sistema de defensa, e inclusive pueden funcionar como reserva de alimento (Griffiths *et al.*, 1999; Reynaud, 2001; Alberts *et al.*, 2002).

Existe una importante diferencia entre los genes y los rasgos de un individuo: el conjunto de genes que portan los seres vivos en cada célula define el genotipo, que es la constitución genética que se hereda. Por otro lado, el conjunto de rasgos compone al fenotipo, que se define como cualquier característica, ya sea estructural, bioquímica, fisiológica o conductual, que sea detectable en un organismo, y se encuentra determinado por complejas interacciones entre el genotipo y los factores ambientales, por lo que es importante notar que un genotipo dado produce fenotipos diferentes en ambientes diferentes (Ayala y Kiger, 1984; Griffiths *et al.*, 1999; Debusk *et al.*, 2005).

Del estudio de la influencia del ambiente en la regulación de la expresión de los genes, surge la genómica nutricional, la cual investiga la relación entre los nutrientes y los genes (Paoloni-Giacobino *et al.*, 2003).

Las aplicaciones que se pueden derivar de estos estudios, han sido desarrolladas principalmente para el tratamiento de las enfermedades en humanos, sobre todo a partir del desciframiento de su genoma (Gillies, 2003; Paoloni-Giacobino *et al.*, 2003; Debusk *et al.*, 2005). Sin embargo, las ventajas de los estudios de dicha relación se han ido aplicando a muchas más especies, con principal atención a la determinación del patrón de adaptación de los organismos, para utilizarlo posteriormente como una referencia aplicable para el cultivo artificial (Fernández *et al.*, 1997; Paoloni-Giacobino *et al.*, 2003).

En este sentido se desarrollan varias líneas de investigación en torno a la acuicultura, pretendiendo principalmente determinar la relación de los factores ambientales, entre ellos el alimento, en la expresión genética de los organismos acuáticos, como es el caso de los trabajos realizados por Torstensen (2006) y Stubhaug (2006), quienes evalúan el efecto del reemplazo del aceite de pescado de la dieta en la expresión proteica del salmón, y de Froystad (2006) quien realizó una comparación de la expresión génica en el intestino del bacalao alimentado con harina de pescado y harina de soya. En este mismo contexto se desarrollan varias de las investigaciones alrededor del cultivo del camarón en nuestro país, algunos ejemplos son los trabajos de Córdova-Murueta (2004), Sánchez-Paz (2003) y Mulhia-Almazan (2002), quienes evaluaron la influencia de factores internos y externos en la expresión de enzimas digestivas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*.

El cultivo del camarón es una industria de gran importancia en México, ya que este animal ocupa el primer lugar de la producción pesquera a nivel nacional y de los \$5 772 millones estimados como el valor de la producción de este recurso para el año 2005, \$3 359 millones fueron obtenidos mediante la acuicultura, es decir que su cultivo representa casi dos terceras partes del valor de la producción total (SAGARPA, 2005), por lo que el conocimiento que se desprenda de las investigaciones acerca de estos

organismos puede ser de gran utilidad para su cultivo y por lo tanto tener una repercusión económica para el país.

El camarón blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei*, es el más cultivado en México y en todo el mundo (Cuzón *et al.*, 2004a; Gaxiola *et al.*, 2006). Debido a sus hábitos alimenticios como omnívoro oportunista, representa la especie con la mejor oportunidad de desarrollo ante la reducción de niveles proteicos en la dieta, la asimilación de carbohidratos y la utilización de proteínas de origen vegetal, lo que lo convierte en un excelente modelo para la investigación (Cuzón *et al.*, 2004a; Gaxiola *et al.*, 2006).

El gasto que representa la alimentación en el cultivo del camarón tiene un impacto substancial, ya que acapara entre 50 y 70% de los costos de producción debido a la utilización de un alto contenido de proteína animal de origen marino en las dietas (Davis *et al.*, 2000; Suresh, 2006). En aras de disminuir dichos costos, se han realizado diversos estudios sobre las estrategias de alimentación y el porcentaje proteico óptimo para lograr una mayor producción y crecimiento de los organismos (Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2006b). Sin embargo, ya que las fuentes proteicas para producir el alimento siguen incrementando sus precios, particularmente el harina y el aceite de pescado, y la demanda de los productos sigue creciendo, es necesario encontrar fuentes de nutrimentos alternos, de menor costo, que cumplan con los requerimientos nutricionales esenciales y substituyan al menos parcialmente a los utilizados hasta ahora (Suresh, 2006; Davis *et al.*, 2006a).

Por otro lado, es necesaria la implementación de nuevas estrategias de alimentación para minimizar los efectos contaminantes de las descargas, ya que el mal manejo que las industrias camaronicultoras hacen de sus desechos, ha dañado severamente a los ecosistemas estuarinos y costeros adyacentes a los sistemas de producción (Martínez *et al.*, 1996; Rosas *et al.*, 2000; Cuzon *et al.*, 2004b). La acumulación de metabolitos nitrogenados residuales y la aportación de fósforo al ambiente como producto de las fuentes de proteína convencionales utilizadas en el alimento, resultan en una eutrofización del medio de cultivo y por lo tanto de los ambientes en donde desembocan los afluentes, lo que provoca la degradación de la calidad del agua debido al aumento del fitoplancton y al crecimiento de algas

filamentosas, y conlleva a una pérdida de hábitat que repercute en una pérdida de biodiversidad (Herrera-Silveira *et al.*, 2005).

Dado este panorama, se explica el interés que existe en desarrollar alimentos que no sean tan perjudiciales para el ambiente, tengan un menor costo de producción y a la vez logren un óptimo crecimiento de los organismos (Martínez *et al.*, 1996; Kuresh y Davis, 2000); dado esto, diversos autores han analizado el reemplazo de las proteínas de la dieta por carbohidratos, como es el caso de Le Moullac (1994), Rosas (2000), Cuzon (2000) y Arena (2003). Sin embargo, dichos estudios han demostrado que esta respuesta es limitada tanto por la falta de sitios para el almacenamiento como por la rápida saturación del procesamiento enzimático (Arena *et al.*, 2003). Esto pudiera ser una consecuencia de la adaptación metabólica para el uso de proteínas como una fuente primaria de energía, debido principalmente a que son estas el mayor sustrato de reserva de los camarones y a la capacidad que estos tienen para sintetizar glucosa a partir de los aminoácidos, mediante la ruta metabólica de la gluconeogénesis (Nelson *et al.*, 2000; Cuzon *et al.*, 2000; Rosas *et al.*, 2000; Cuzon *et al.*, 2004b).

Es por esto que la implementación de dietas con contenido proteico vegetal surge como una potencial alternativa con múltiples ventajas respecto a las dietas basadas en carbohidratos y proteína animal, ya que los costos de las fuentes de proteína vegetal son mucho más bajos, su calidad es constante, y su impacto ambiental menor, lo que las convierten en una fuente nutricional, económica y ambientalmente viable (Martínez *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 2000, Gaxiola *et al.*, 2006).

El uso de fuentes proteicas de origen vegetal se ha visto limitado por diversos motivos, tales como la presencia de antinutrientes, la carencia de aminoácidos esenciales como la lisina y la metionina y la falta de palatabilidad (Martínez *et al.*, 1996; Maldonado 2007). Sin embargo, los resultados de diversos estudios, han reportado que al menos en la fase postlarval de *L. vannamei*, no hay una diferencia significativa en cuanto al crecimiento y supervivencia en organismos alimentados con dietas en las que se sustituyó hasta en un 90% la proteína de origen animal por combinaciones de proteína de origen vegetal de diversas fuentes (Cuzon *et al.*, 2004b; Gaxiola *et al.*, 2006; Maldonado, 2007). Por otra parte, para poder implementar este

tipo de dietas, es necesario identificar los indicadores genéticos y fisiológicos que pongan en evidencia la calidad del producto final.

En las investigaciones sobre los efectos del alimento, las enzimas digestivas han sido ampliamente estudiadas, ya que son elementos clave que actúan como mediadores entre la ingesta de comida y la asimilación de los nutrientes, por lo que juegan un papel muy importante en el desarrollo y crecimiento de los organismos (Sainz *et al.*, 2004a;). Las enzimas digestivas encargadas de romper los componentes de los alimentos, para que los organismos puedan asimilarlos, se dividen en tres grandes grupos: carbohidrasas, lipasas y proteasas, correspondientes a los tres principales tipos de nutrientes (Randall *et al.*, 2002). Cada enzima se puede presentar de múltiples formas que reciben el nombre de isoformas o isoenzimas, por lo general presentan secuencias aminoacídicas similares pero no idénticas y catalizan la misma reacción pero habitualmente difieren en propiedades reguladoras o cinéticas (Carrillo y González, 1997). El patrón de aparición de dichas isoformas se puede ver afectado por diversos factores tanto externos como internos, por lo que su regulación puede ser utilizada como un indicador de múltiples factores, como es el caso de los efectos de los componentes de las dietas, así como de la capacidad de los individuos para asimilar dichos componentes (Van Wormhoudt *et al.*, 1996; Arena *et al.*, 2003; Sánchez-Paz *et al.*, 2003).

El presente estudio se centra en el análisis de la tripsina, que es la enzima digestiva más abundante en *Litopenaeus vannamei* y representa por sí sola el 60% de la actividad proteásica del hepatopáncreas en los crustáceos peneidos, lo que la convierte en una enzima muy importante en cuanto al desarrollo biológico y las adaptaciones alimenticias de estos organismos (Cruz-Suarez, 1996; Sanchez-Paz *et al.*, 2003). La tripsina es una glucoproteína que está clasificada como una endoproteasa de la familia de las serin proteasas, que se caracterizan por poseer un mecanismo catalítico en donde se presentan residuos de serina, histidina y aspartato (Klein *et al.*, 1996; Sainz *et al.*, 2004a). La tripsina hidroliza el enlace peptídico que se forma entre los aminoácidos con carga positiva dentro de una proteína como la arginina y la lisina y de esta manera la rompe o digiere (Geiger y Fritz 1988; Stryer *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2004a; Sainz *et al.*, 2005).

Debido a su actividad proteolítica, la tripsina es sintetizada como un zimógeno, el tripsinógeno, que es un precursor inactivo de la enzima que se activa mediante la hidrólisis de un segmento en el extremo amino terminal. La síntesis y el almacenamiento de la tripsina en esta forma inactiva, son necesarios para mantener la integridad de las células secretoras y funcionan como mecanismo regulador para lograr una rápida secreción y activación (Hernández-Cortes *et al.*, 1999; Nelson *et al.*, 2000; Sainz *et al.*, 2004b).

Dada su importancia, la regulación de la tripsina en los camarones peneidos ha sido objeto de muchos estudios, como el de Klein (1996) en donde confirmó que esta enzima posee un alto grado de polimorfismo y logró caracterizar 5 diferentes secuencias codificantes (cDNA) presentes en el hepatopáncreas de *L. vannamei*, las cuales asoció en dos familias basándose en las diferencias entre sus nucleótidos. Posteriormente en 1998, la misma autora obtuvo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuencia de un nuevo gen perteneciente a una tercera familia. Desde entonces, mediante el análisis de la influencia de diversos factores tanto internos como externos, se han logrado observar mediante la técnica de electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida, cuatro isoformas de la tripsina (Klein *et al.*, 1996; Mulhia-Almazán *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2005). Tres de éstas isoenzimas fueron purificadas y caracterizadas por Sainz (2004a), donde determinó que su peso en condiciones no reductoras es de 21, 22 y 23 kDa respectivamente y que presentan distintas propiedades cinéticas, lo que sugiere que los diferentes fenotipos están asociados a una digestión diferencial.

La técnica más utilizada para analizar la heterogeneidad y el peso molecular de las proteínas es la electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (García-Carreño *et al.*, 1993). El método de electroforesis fue empleado por primera vez por Tiselius en 1937. Su fundamento es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, dependiendo de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de polilacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés), el cual funge como una matriz en donde se puede controlar el tamaño de los poros para lograr la separación de las proteínas. El dodecilsulfato de sodio (SDS) se introduce en esta

técnica en 1970. Este es un detergente que desnaturaliza las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria (García, 2000). Todos los complejos SDS-proteína de la muestra toman carga negativa, por lo que la relación carga/masa es aproximadamente igual, lo que convierte al peso molecular en el factor determinante de la separación. Una de las técnicas utilizadas para la determinación de las proteasas consiste en la inmersión del gel en un sustrato, provocando que ocurra una reacción entre este y la enzima de interés (García-Carreño *et al.*, 1993).

La tinción del gel se lleva a cabo con azul de Coomassie. Esta tinción se basa en la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas, por lo que se revela una banda blanca en donde hubo una reacción de la enzima con el sustrato, evidenciando así la ubicación de las proteasas en el gel (García-Carreño *et al.*, 1993; García, 2000)

Dado que los camarones presentan exoesqueleto, su crecimiento depende de su muda. La muda consiste en perder las conexiones entre los tejidos vivos y la cutícula extracelular, liberarse de ésta cutícula de manera rápida, absorber agua para expandir el nuevo exoesqueleto que se encuentra flexible y posteriormente endurecerlo para poder llevar a cabo las funciones de alimentación, locomoción y defensa (Chang, 1995). La muda, se lleva a cabo mediante varios estadios divididos de manera general en Postmuda (A y B), Intermuda (C), Premuda (D) y Écdisis (E). A lo largo de estos estadios, se producen variaciones morfológicas y fisiológicas muy importantes dentro de las cuales se encuentran cambios en la expresión enzimática (Cruz-Suarez, 1996; Klein *et al.*, 1996). En la Tabla 1 se presenta un resumen de los principales acontecimientos que ocurren durante los diferentes estadios del ciclo de muda de *Litopenaeus vannamei*.

Tabla 1.

Resumen de los principales acontecimientos que ocurren dentro de los estadios de muda de *Litopenaeus vannamei*.

Estadio	Principales Acontecimientos
"A" o Postmuda temprana	Absorción de agua y minerales para el

	aumento de tamaño y endurecimiento del nuevo exoesqueleto. No hay ingesta de alimento ya que las estructuras digestivas se encuentran muy débiles. La actividad metabólica enzimática es baja.
“B” o Postmuda tardía	Continúa la mineralización y ocurre la ingesta de alimento. La actividad metabólica enzimática presenta su pico más bajo.
“C” o Intermuda	Exoesqueleto y estructuras digestivas mineralizadas. Ingesta de alimento activa y actividad metabólica enzimática alta.
“D” o Premuda	Reabsorción de Calcio en la Dermis para evitar su pérdida durante la ecdisis. Pico más alto de alimentación y actividad metabólica enzimática. Acumulación de reservas.
“E” o Ecdisis	Desprendimiento de la cutícula extracelular. Su duración es de unos segundos.

Información obtenida de Chang, 1995; Cruz-Suárez, 1996; Klein *et al.*, 1996; Sánchez-Paz *et al.*, 2003 y G. Gaxiola, com. pers.

Al llevar a cabo un estudio sobre enzimas digestivas, los análisis que se realicen deben delimitarse a individuos que se encuentren en el mismo estadio de muda, para de esta forma evaluar los efectos del factor experimental y no los cambios inherentes al ciclo de muda. Dadas las características que se presentan durante el estadio “C”, los análisis realizados durante éste estadio reflejan las condiciones metabólicas más estables de los organismos.

Tomando en consideración lo antes descrito, el presente trabajo se centra en conocer el efecto regulador de las proteínas de la dieta dependiendo de su origen (vegetal y animal) en la expresión fenotípica de la tripsina en la fase juvenil del camarón *Litopenaeus vannamei*. Este efecto se analizó relacionando la supervivencia y



el crecimiento de organismos en dicha fase en el estadio “C” o de intermuda con el patrón de isoformas revelado mediante la electroforesis desnaturizante en geles de poliacrimida (SDS-PAGE).

Tomando en consideración lo antes descrito, el presente trabajo se centra en conocer el efecto regulador de las proteínas vegetal y animal administradas en la dieta desde la etapa postlarval, en la expresión fenotípica de la tripsina en la fase juvenil del camarón *Litopenaeus vannamei*. Este efecto se analizó relacionando la supervivencia y el crecimiento de organismos en dicha fase en el estadio “C” o de intermuda con el patrón de isoformas revelado mediante la electroforesis desnaturizante en geles de poliacrimida (SDS-PAGE).

## 2. Objetivos

### Objetivo general

- Evaluar la expresión fenotípica de la tripsina en individuos juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con proteínas de origen vegetal y animal contenidas en la dieta en condiciones de cultivo

### Objetivos específicos

- Determinar mediante la técnica de electroforesis, las diferencias en el patrón de isoformas de la tripsina en el estadio C de individuos juveniles de *Litopenaeus vannamei* alimentados con proteína de origen animal y proteína de origen vegetal durante las fases postlarval y juvenil.

- Evaluar los parámetros zootécnicos de los individuos juveniles alimentados con ambas dietas.

- Evaluar la actividad enzimática de la tripsina según el origen de proteína con el que fueron alimentados.

### 3. Hipótesis

Hipótesis nula:

Si se alimenta a *L. vannamei* con dietas que contengan diferentes fuentes proteicas (vegetal y animal) la expresión fenotípica de la tripsina no variará.

Hipótesis alternativa:

Si se alimenta a *L. vannamei* con dietas que contengan diferentes fuentes proteicas (vegetal y animal), se observaran cambios en la expresión fenotípica de la tripsina.

## 4. Metodología

El presente trabajo se realizó en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias, UNAM, en Sisal, Yucatán (figura 1), en el periodo comprendido entre agosto de 2006 y octubre de 2007.



Fig. 1. Ubicación de UMDI (Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación), Puerto Sisal, Yucatán, México.

### 4.1 Material biológico

Los organismos utilizados fueron identificados como *Litopenaeus vannamei* comúnmente llamado “camarón blanco del Pacífico”, el cual se ejemplifica en la figura 2.



Fig 2. Camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*

Su clasificación es la siguiente:

Phylum: Artropoda.

Superclase: Crustacea. Pennant, 1777.

Clase: Malacostra. Latreille, 1806.

Orden: Decápoda. Latreille, 1803.

Suborden: Dendrobranchiata. Bate, 1888

Superfamilia: Penaeoidea. Rafinesque-Schmaltz, 1815

Familia: Penaeide.

Género: *Litopenaeus*. Pérez Farfante, 1967

Especie: *vannamei* Boone. 1931

*Litopenaeus vannamei* se distribuye en el este del océano Pacífico, desde Sonora México hasta Tumbes, al norte de Perú. Tiene preferencia por los fondos lodosos y se distribuye desde la línea de costa hasta profundidades de 72 metros (Dore y Frimodt, 1987; Perez-Farfante y Kensley, 1997). El ciclo de vida de estos organismos se distingue por la presencia de una fase larval compleja, acompañada por etapas de vida planctónica y bentónica, que incluye una penetración en aguas salobres a esteros y lagunas litorales y una migración a aguas oceánicas (FAO, 1974).

#### 4.1.1 Origen de los organismos

Los organismos provinieron de La Paz, Baja California, de la empresa “Acuicultores del Pacífico”. Fueron transportados a Tabasco, a la granja camaronera “Hermanos Peña Benítez”, en donde se llevo a cabo la cría larval mediante el método de Galveston (Smith, *et al.*, 1993).

El transporte de los organismos, se llevó a cabo en bolsas de plástico con oxigenación saturada y rodeadas de hielo para disminuir su metabolismo y evitar el estrés. 10 000 individuos arribaron a la UMDI en estadio de postlarva 15 (pL 15, es decir que los individuos llevaban 15 días en éste estadio) y fueron mantenidas en una tina de 400 litros. En esta etapa, su alimentación constó de *Artemia salina* (3 nauplios/ml), microalgas *Tetraselmis chuii* (20 000 cel/ml) y “pellet” (40% de proteína animal, tamizado a menos de 350µm). Se mantuvieron en estas condiciones hasta llegar a postlarva 25 (pL 25).

#### 4.2 Diseño y dispositivo experimental y composición de dietas.

El experimento constó de dos fases. La primera, fue realizada en los meses de febrero y marzo, con una duración de 36 días en los que se administraron dos dietas, una con origen proteico vegetal y la otra con origen proteico animal. La segunda fase se llevó a cabo en el periodo de marzo a mayo, y 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 3. La secuencia en la cual se asignaron las dietas a las taras en ambas fases fue obtenida azarosamente.

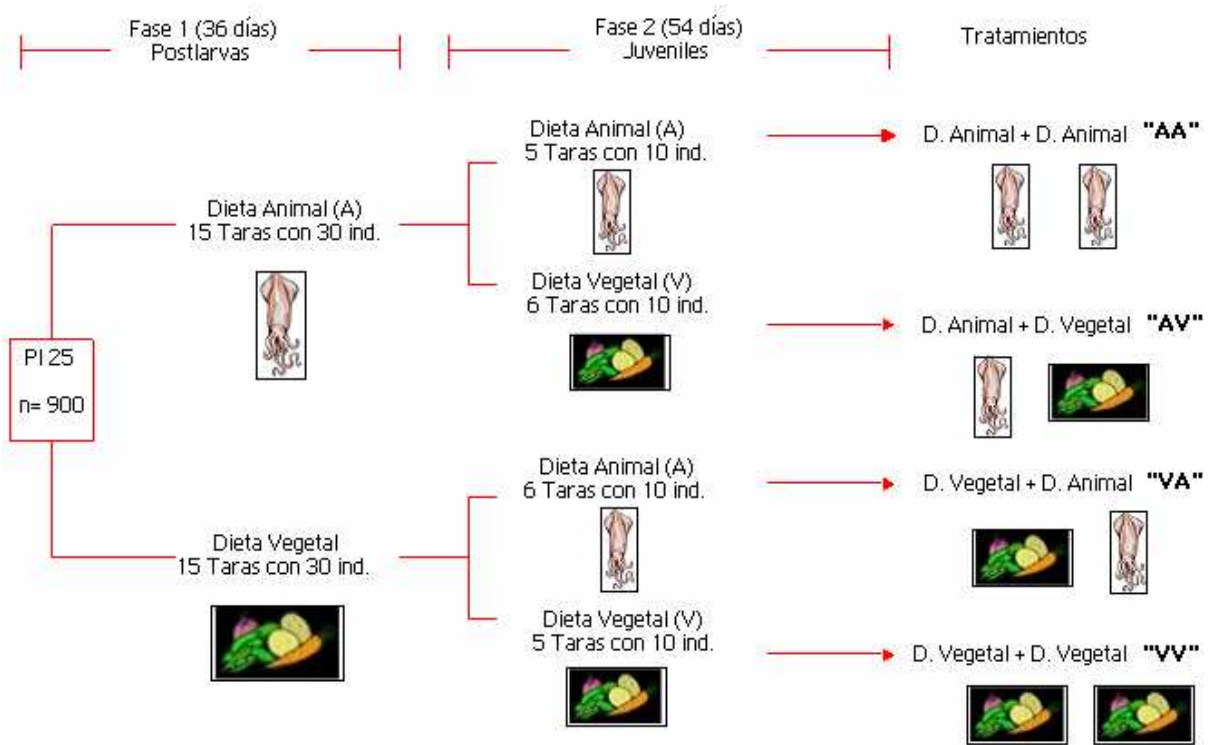


Fig. 3. Esquema de diseño experimental. Se indican las rutas mediante las cuales se obtuvieron los cuatro tratamientos, "AA", "AV", "VA" y "VV"

Las dietas, fueron diseñadas y producidas en el Laboratorio de Nutrición de la UMDI de la siguiente manera: se homogenizan los ingredientes secos de cada dieta (Tabla 2), durante 20 min. en una mezcladora, posteriormente se agrega a la mezcla aceite de hígado de bacalao y aglutinante (Carboximetil celulosa) previamente hidratado. Se vierte un poco de agua hasta que la mezcla obtenga una consistencia

pastosa y se procesa en un molino de carne, del cual se obtienen tiras tipo spaghetti que se someten a un proceso de secado en la estufa durante 10 horas a 60° C. De esta manera se obtienen los “pellets”, que se almacenan a 4°C. El tamaño de la partícula con que se alimenta se obtiene moliendo y tamizando el alimento seco y depende del tamaño de las larvas.

Tabla 2.

Composición de las dietas suministradas a los organismos durante el experimento.

<b>Ingredientes</b>	<b>Animal (Calamar) ( g / 100 g)</b>	<b>Vegetal (coctel) ( g / 100 g)</b>
NSM h. de pescado LT	16	9
Pasta de soya	15	
Harina de trigo	14	10,5
Calamar seco	30	
Conc. proteico de soya		30
Conc. proteico de papa		5
Gluten de trigo		9
Espirulina		9
Aceite de bacalao	3.5	5
Lecitina de soya	2	2
Colesterol	0.5	0.5
Almidón	14.5	16.5
Vitamina C	0.0286	0.45
Vitaminas	2	1
Agglutinante	1	1
Zeolita (Marcador para digestibilidad)	1.5	1.5
<b>Total</b>	<b>100 %</b>	<b>100 %</b>

Se indican con azul los ingredientes que solamente forman parte de la dieta animal y con verde los ingredientes que solamente forman parte de la dieta vegetal

Tabla 3.

Valor nutricional de dietas experimentales suministradas a los camarones "*L. vannamei*"

	Dieta Animal "A"	Dieta Vegetal "V"
Lípidos	9.42%	9.92%
Carbohidratos	25.25%	24.64%
Proteína	46.81%	43.56%
Energía digerible kJ/g	17	15

#### Fase experimental 1

Se emplearon 30 taras plásticas con capacidad de 30 litros y un sistema de aireación constante, en cada una de las cuales se sembraron 30 individuos, como se ilustra en la fotografía izquierda de la figura 4. Se realizó un recambio de agua diario de un 50%.

#### Fase experimental 2

Se utilizaron 22 taras plásticas con capacidad de 50 litros y un sistema de aireación constante, donde se sembraron 10 individuos en cada una, como se ilustra en la fotografía derecha de la figura 4. Se contó con un sistema de flujo cerrado, en donde el agua permanecía en circulación y filtración.



Figura 4. Izq. Fotografía del dispositivo experimental utilizado en la Fase 1. Der. Fotografía del dispositivo experimental utilizado en la Fase experimental 2.



Durante las dos fases del experimento, los camarones se alimentaron 3 veces al día, a las 08:00, 14:00 y 20:00 hrs. La cantidad de alimento a suministrar fue ajustado de acuerdo al remanente que se observaba en las taras, asegurando que siempre se administrara *ad libitum*. Los residuos de alimento y heces fecales se removieron todos los días a las 11:00 hrs. mediante sifoneo con mangueras de aireación.

El agua que se utilizó durante el experimento se sometió a diversos procesos para asegurar su buena calidad, estos fueron: 1) filtración con un filtro de arena de lecho profundo, 2) paso por lámparas de luz ultravioleta, 3) paso por Ozonificador para controlar la presencia de bacterias y 4) desproteínización mediante un espumador. Diariamente se monitorearon los parámetros de salinidad, concentración de oxígeno y temperatura.

#### 4.3 Obtención de las muestras

Al final de la segunda fase se realizó un muestreo en donde se registró el crecimiento y la supervivencia y se obtuvieron las muestras, para lo cual los organismos fueron pesados y disecados. El estadio de muda se determinó a partir de un urópodo (Aquacop, 1975). Los tejidos fueron inmediatamente congelados de manera individual en nitrógeno líquido (-196 °C).

##### 4.3.1. Preparación de las muestras

Se homogenizaron los hepatopáncreas de los individuos en estadio de muda C que se obtuvieron en el muestreo, en 500 µl de agua ultrapura. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 14 000 rpm. durante 20 min. a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. A partir de esta solución se consiguieron diluciones 1:10 y 1:100.

#### 4.4 Actividad enzimática de la tripsina

Este análisis se llevó a cabo en las muestras de los individuos en estadio de muda “C” o intermuda obtenidas en la segunda fase del experimento, mediante el método de Geiger (1988), el cual se lleva a cabo de la siguiente manera:

Se calibra el espectrofotómetro realizando una lectura a 450 nm. de una cubeta de 1 ml. con una solución homogénea de buffer Tris 0.1 M pH8 y sustrato BAPNA (Benzoil-arginine-paranitroAnilide). A continuación se agrega a la solución 10µl de dilución 1:10 de extracto de hepatopáncreas, y se homogeniza, se coloca la cubeta en el espectrofotómetro y se calibra a cero.

Posteriormente se registran los valores de absorbancia del primer y segundo minutos, ya que dividiendo su diferencia entre el coeficiente de extinción ( $\epsilon_{405} = 1.02 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), y dividiendo el resultado entre el volumen de la alícuota de la muestra expresada en ml., se obtiene la unidad de actividad proteolítica de la enzima.

$$\text{U/ml.} = (\text{Dif abs.} / \epsilon_{405}) / \text{ml. de alícuota}$$

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que se requiere para liberar 1 mM de sustrato en un minuto.

#### 4.5 Electroforesis

Para determinar la presencia y la variación de las isoformas de la tripsina, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, en un medio desnaturizante de SDS (Sodium-dodecyl sulfate) (Anexo 1).

##### 4.5.1. Preparación de las muestras para la corrida de electroforesis

Antes de descongelar las muestras y con el fin de que permanezcan a temperatura ambiente lo menos posible, se colocan en una placa de frío cubierta con papel parafilm<sup>®</sup>, 15 alícuotas de 5µl de solución de azul Bromofenol (Anexo 1). Posteriormente se descongelan las muestras y se mezclan 10 µl de cada una con una de las alícuotas de la solución de azul de Bromofenol.

##### 4.5.2 Preparación del marcador

Para clasificar las enzimas que se desprendieron de la electroforesis se utiliza un marcador de bajo peso molecular (Sigma Marker<sup>®</sup>, M3913-10VL). De la misma forma que las muestras, se mezclan 5µl de marcador con 5µl de solución de azul de Bromofenol.

#### 4.5.3. Corrida de las muestras

La corrida electroforética se lleva a cabo a 4°C y 100 V durante 90 min., supervisando que el frente de corrida quede a 2 cm. del final de la placa.

#### 4.5.4. Revelado del gel

Al terminar el tiempo de corrida, los geles se lavan con agua destilada en tres sesiones de 5 min., para que no queden residuos de SDS y las enzimas puedan recuperar su forma nativa y reaccionar con el sustrato, en este caso Caseína al 1% en Buffer fosfato a pH 8. Se llevan a cabo dos incubaciones, la primera con una duración de 30 min. a 4 °C para que el sustrato (Caseína 1%) se difunda bien por todo el gel y la segunda con una duración de 90 min. a 37 °C, en donde ocurre la reacción enzimática (García-Carreño *et al.*, 1993). Al terminar la incubación se repite el tratamiento de lavado en 3 sesiones de 5 min. y se tiñe con una solución de azul de Coomassie (Anexo 1). La tinción se lleva a cabo introduciendo los geles por lapsos de 10 segundos al horno de microondas hasta que presenten el mismo tono que la solución. Posteriormente se dejan reposar durante 10 a 15 min. a temperatura ambiente en constante agitación. La destinción se realiza con una solución de decoloración rápida (Anexo 1), en donde se sumergen los geles y se mantienen durante aproximadamente dos horas a temperatura ambiente y en constante agitación. Al término se sumergen en agua ultrapura, donde permanecen toda la noche.

#### 4.6. Análisis Estadístico de los resultados

En el análisis de los datos de supervivencia, crecimiento y actividad enzimática, se aplicó un modelo bifactorial, con la dieta inicial (Fase 1) como factor 1 y la dieta final (Fase 2) como factor 2.

Se aplicó la transformación angular a los datos porcentuales de supervivencia previo a su análisis. Se corroboró la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Cochran (en el caso de datos balanceados), y con la de Bartlett, para los datos no balanceados, para los cuales también se corroboró la distribución normal (Underwood, 1997).

## 5. Resultados

### 5.1 Supervivencia

Al comparar estadísticamente las medias de los tratamientos, no se encontró interacción entre el efecto de la dieta inicial y la final ( $p=0.32$ ,  $F=1.01$ ). Por otro lado se concluyó que no existe diferencia significativa entre ninguno de los cuatro tratamientos debido al efecto de la dieta inicial ( $p=0.36$ ,  $F=0.85$ ) ni debido al efecto de la dieta final ( $p= 0.84$ ,  $F= 0.04$ ).

El porcentaje de supervivencia más alto fue el del tratamiento VA (organismos alimentados con dieta Vegetal durante la primera fase y con dieta Animal durante la segunda), con 90%, seguido por el tratamiento VV (organismos alimentados con dieta Vegetal durante las dos fases), el cual logró 88.33% de supervivencia. El tratamiento AA (organismos alimentados con dieta Animal durante las dos fases) terminó la segunda fase con el 88% de los individuos, y la supervivencia más baja fue la del tratamiento AV (organismos alimentados con dieta Animal durante la primera fase y con dieta Vegetal durante la segunda) con 85%. Estos porcentajes se encuentran representados en la figura 5.

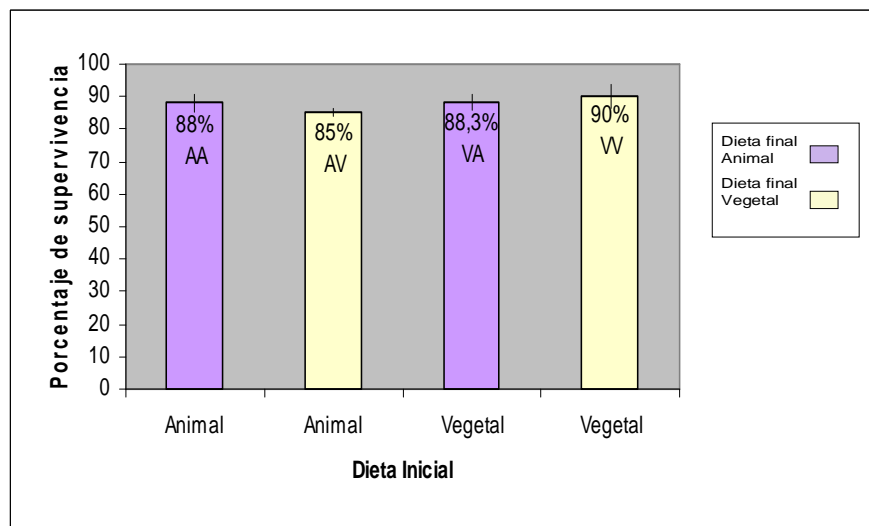


Figura 5. Gráfica de la relación de la dieta inicial y final con el porcentaje de supervivencia de los cuatro tratamientos aplicados a los camarones *L. vannamei*.

## 5.2 Crecimiento

El tratamiento que presentó el peso promedio mayor, con 9.39gr fue VA, mientras que los organismos del tratamiento AA presentaron una media de 8.61gr. Por otro lado, los individuos del tratamiento AV, presentaron una media de 7.92 gr., mientras que aquellos del tratamiento VV fueron los que obtuvieron la media menor, siendo esta de 6.60 gr. Estos datos se encuentran representados en la figura 6.

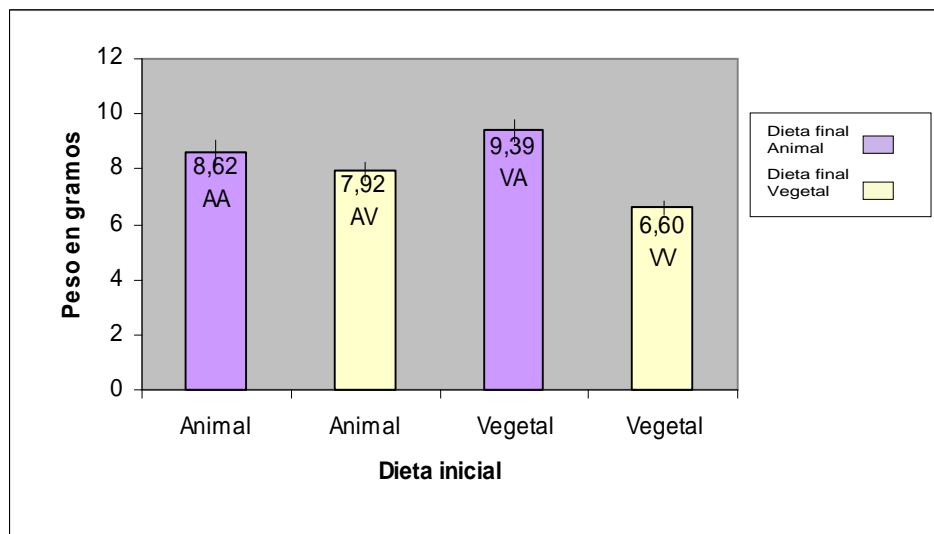


Figura 6. Gráfica de la ganancia en gramos (crecimiento) en camarones *L. vannamei*, alimentados con diferentes fuentes proteicas. Relación de la dieta final e inicial con el peso promedio en gramos de los individuos de los cuatro tratamientos

Mediante el análisis bifactorial de los datos, se determinó que el efecto de la dieta inicial y la dieta final son dependientes ( $p= 0.01$ ,  $F= 6.07$ ). Se encontró que no se presentó una diferencia significativa entre los organismos debido al efecto de la dieta inicial ( $p= 0.57$ ,  $F=0.31$ ), más ésta si se presenta con el efecto de la dieta final ( $p<0.05$ ,  $F=17.31$ ).

Por otro lado, se determinó que existe una diferencia significativa entre los organismos cuya dieta inicial fue Vegetal (VV y VA) ( $p< 0.05$ ), siendo los alimentados con dieta animal durante la fase 2 (VA) los que obtuvieron un mayor crecimiento, como se muestra en la figura 6.

### 5.3 Actividad enzimática de la tripsina

En la figura 7 se encuentran representados los resultados de la actividad enzimática de la tripsina obtenida para los 4 tratamientos. El tratamiento AA presentó la mayor actividad enzimática con una media de 0.94 mU/mg, mientras que el tratamiento VV presentó la menor actividad con una media de 0.3 mU/mg. El tratamiento AV presentó una media de 0.5 mU/mg, mientras que el tratamiento VA presentó una media de 0.6 mU/mg

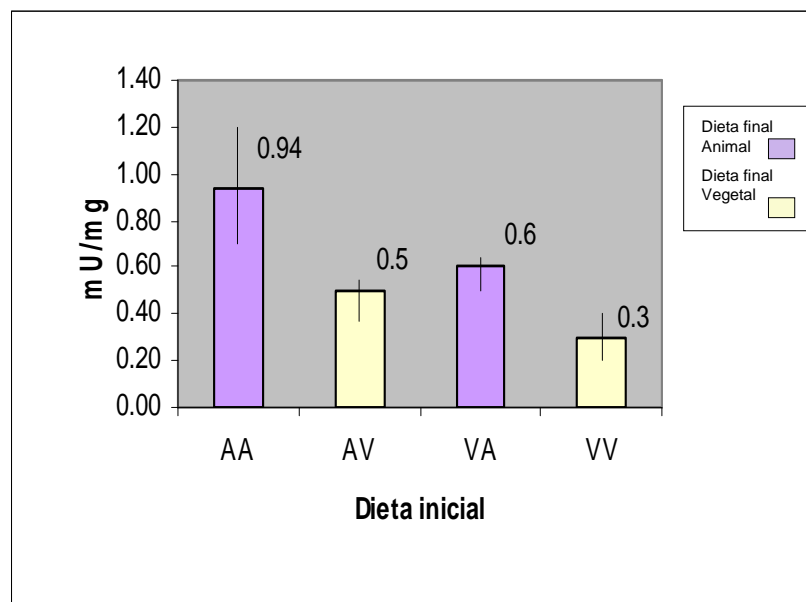


Fig. 7. Relación de las dietas inicial y final con la actividad enzimática de la tripsina de los individuos *L. vannamei* a los que se aplicaron los cuatro tratamientos

Después de la comparación estadística de las medias de los tratamientos, se determinó que los efectos de la dieta inicial y final no presentaron una interacción ( $p=0.79$ ,  $F=0.072$ ) y que existió una diferencia significativa entre los tratamientos AA y VV ( $p=0.029$ )

### 5.4 Isoformas de tripsina

El zimograma observado consta de 4 bandas en el intervalo de 14 a 20 kDa, como se ilustra en la figura 8. El patrón de estas bandas coincide con el referido en la literatura como el de la tripsina.

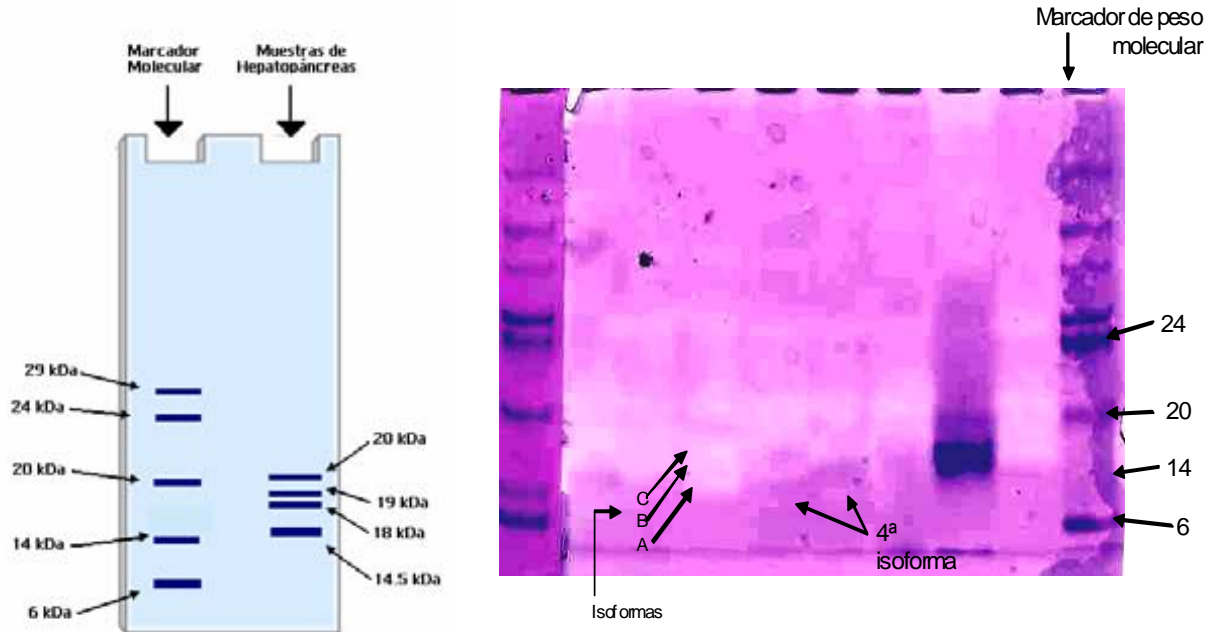


Fig.8. Der. Esquema de la posición de las bandas encontradas en el gel. Izq. Fotografía del gel de electroforesis con muestras de hepatopáncreas de *L. vannamei* en condiciones nativas. Las isoformas de la tripsina se encuentran indicadas, así como los marcadores de peso molecular.

Los fenotipos que se obtuvieron mediante el análisis de los geles se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 4.

Fenotipos obtenidos mediante electroforesis de los organismos muestreados de los cuatro tratamientos

Bandas	Tratamientos			
	AA	AV	VA	VV
20 kDa	X	X	X	X
19 kDa	X	X	X	X
18 kDa	X	X		X
14.5 kDa		X	X	X

## 6. Discusión

### 6.1 Zootecnia

Los resultados nos indican que los organismos alimentados con proteína vegetal son capaces de obtener el mismo porcentaje de supervivencia que los individuos alimentados con proteína animal, no sólo en el estadio de postlarvas como se había concluido en trabajos anteriores como el de Brito (2004), Cuzon (2004b), Jiménez (2004), Gaxiola (2006) y Maldonado (2007), sino también al ser alimentados con esta fuente proteica en el estadio de juveniles. Los resultados en cuanto al crecimiento coinciden con lo propuesto por los mismos autores quienes plantean que debido a la naturaleza omnívora de *Litopenaeus vannamei*, las postlarvas alimentadas con dieta Vegetal son capaces de alcanzar las mismas tallas que cuando son alimentados con dieta Animal. En el presente trabajo se observó que las postlarvas alimentadas con dieta Vegetal, al seguir ingiriendo dicha dieta en la etapa de juveniles (VV), presentan un crecimiento muy bajo, en comparación con los individuos con la misma dieta inicial que al pasar al estadio juvenil se alimentan con proteína animal (VA), los cuales presentaron el mayor crecimiento de los cuatro tratamientos (figura 6).

### 6.2 Actividad enzimática

La actividad enzimática es un parámetro que indica la degradación química del alimento. Ésta varía con los ritmos cronobiológicos, durante el desarrollo ontogénico, durante la muda, debido al tipo de alimento y a los factores ambientales (Cruz, 1996; Gaxiola, 2006), por lo que la influencia de uno de estos factores de manera aislada se debe analizar con reserva. Sin embargo, este parámetro ha sido utilizado como un índice del estado nutricional de los camarones en condiciones de cultivo para estimar una formulación adecuada en las dietas ya que es una referencia directa sobre la respuesta de las enzimas (Lemos y Rodríguez, 1998).

Maldonado (2007), no encontró diferencias significativas entre postlarvas de *Litopenaeus vannamei* alimentadas con dietas con proteína animal y proteína vegetal. Por otro lado, Lemos y Rodríguez (1998) y Gaxiola *et al.* (2006) encontraron que la



actividad enzimática de *Penaeus japonicus* y *Litopenaeus vannamei* sometidos a diferentes tratamientos, solamente presentan diferencias al pasar al estadio de juveniles, cuando el hepatopáncreas está formado en su totalidad. Con base en estos estudios, se puede deducir que los cambios en la actividad enzimática que se observan entre los tratamientos ocurren en el estadio de juveniles.

Dado que los resultados entre los tratamientos varían dependiendo de la dieta con la que los individuos son alimentados en el estadio de postlarvas proponemos que el efecto de las dietas a pesar de no expresarse durante la primera fase, es acumulativo, lo que concuerda con las diferencias entre los tratamientos, donde los organismos que se alimentaron con dieta vegetal durante las dos fases (VV) presentaron la menor actividad, los que se alimentaron con proteína animal durante las dos fases (AA) la mayor y los que se sometieron a un cambio de dieta (AV y VA) presentaron valores intermedios, como se representa en la figura 7.

En los trabajos de Brito (2004) y Gaxiola (2006) se analizaron los efectos del origen de la proteína contenida en la dieta en *Litopenaeus vannamei*, de igual manera que en esta investigación, se encontró una mayor actividad enzimática de la tripsina en los individuos alimentados con proteína animal que en los individuos alimentados con proteína vegetal. Sin embargo, en dichos estudios, los valores de las demás proteasas como la quimotripsina, carboxipeptidasa y aminopeptidasa se expresaron de manera irregular por lo que plantean que es posible que haya existido una compensación por parte de las otras proteasas en la degradación de las proteínas, y que la baja actividad de la tripsina tal vez se deba a la presencia de un inhibidor en los concentrados proteicos vegetales.

Si comparamos los resultados de actividad enzimática y crecimiento de los tratamientos con dieta inicial animal (AA y AV) con los resultados de los tratamientos con dieta inicial vegetal (VA y VV), encontramos que los efectos de las dietas finales, exhiben el mismo patrón, donde la dieta vegetal está asociada a un menor crecimiento y actividad enzimática y la dieta animal a un mayor crecimiento y actividad enzimática. Los resultados obtenidos en los tratamientos en los que hubo un cambio de dieta (VA y AV) indican cómo el efecto de la dieta inicial se contrarresta con el efecto de la dieta final, ya sea en aumento o decaimiento.

Estos resultados sugieren que los individuos que ingerían dieta con proteína de origen vegetal cuando eran postlarvas presentaban un esfuerzo digestivo, es decir que estaban desempeñando más trabajo para poder obtener nutrientes a partir de su alimento que aquel que desempeñaban los individuos alimentados con proteína animal. Al pasar al estadio de juveniles a dieta con proteína animal, el mismo esfuerzo digestivo aplicado a ésta proteína produjo un mejor aprovechamiento de los componentes de la dieta, lo que explica que el crecimiento que presentan los individuos del tratamiento “VA” sea el mayor. Por el contrario, los organismos que siguen siendo alimentados con dieta Vegetal durante la segunda fase (tratamiento “VV”) permanecen realizando este esfuerzo digestivo, sin obtener los nutrientes necesarios para un óptimo desarrollo, por lo que presentan valores más bajos tanto de crecimiento como de actividad enzimática. Estos valores se encuentran representados en la figura 6. Llama la atención la posibilidad de instaurar una técnica de alimentación basada en la manipulación del esfuerzo digestivo que se puede obtener mediante la alternación del origen proteico de las dietas para alcanzar valores más elevados de crecimiento.

A pesar de que en crustáceos no se ha estudiado una técnica en donde se manipule el esfuerzo digestivo, esta sí se ha llevado a cabo en animales de granja. Existe una técnica, utilizada sobre todo en ovejas, llamada “Flushing” (nivelación), que consiste en administrar raciones más grandes y mejoradas de alimento a las hembras unas semanas o días antes de que ocurra el apareamiento, con el fin de mejorar su desempeño reproductivo. La técnica se basa en que dado que el metabolismo de los organismos está acostumbrado a un menor aporte de nutrientes, al recibir éste estímulo, las hembras presentan un mejor desempeño reproductivo, logrando tener más descendencia en mejores condiciones (Venter y Greyling, 1994). Al término de la temporada de reproducción, la ración y los complementos alimenticios son disminuidos para de esta forma reducir el peso de los individuos, por ende los costos de alimentación, y poder aplicar la misma técnica en la temporada de reproducción siguiente (Bianchi *et al.*, 2001). Aunque existen grandes diferencias en el manejo de estos rumiantes con el de la camaronicultura, esta técnica puede servir como un antecedente sobre la utilización del esfuerzo digestivo para lograr crecimientos o desarrollos acelerados en etapas críticas del organismo. Es importante remarcar que diversos estudios sobre esta técnica, han demostrado que si las ovejas no se encuentran en un buen estado alimenticio durante

todo el año, no se obtienen buenos resultados, por lo que se debe contar con un control muy riguroso en la adecuación de las raciones cuando no es temporada de reproducción (Molle *et al.*, 1997; Bianchi *et al.*, 2001 y Sormunen-Cristian y Jauhiainen, 2002).

En organismos marinos, lo más parecido a una técnica de manipulación del esfuerzo digestivo mediante el contenido dietético, han sido los trabajos realizados por P.C. Morris (2003), quien investigó el efecto de alterar la proporción de proteína y lípidos en la dieta, en diferentes etapas de la fase de crecimiento del salmón *Salmo salar*. Su trabajo se centra en diseñar un programa de alimentación en el que la proporción proteína/energía vaya descendiendo, asegurando que los cambios en la dieta ocurran en el momento adecuado, es decir, sin afectar, o en el mejor caso favoreciendo el crecimiento de los organismos. Morris se basó en los estudios realizados por Einen *et al.* en 1999, quienes concluyeron que los efectos de los cambios en la proporción proteína/energía en los salmones son más marcados en individuos de cierto peso. Estas conclusiones concuerdan con lo observado mediante la técnica de “Flushing” en las ovejas, en donde los resultados que se obtienen del tratamiento, también dependen de la condición alimenticia en la que se encuentren los organismos.

En el cultivo del camarón, existen dos momentos críticos en los que sería muy aprovechable un mayor crecimiento o un desarrollo acelerado de los organismos: cerca del momento de cosecharlos, en el caso de *Litopenaeus vannamei*, alrededor de los 8 o 9 meses, dependiendo de la demanda del mercado, y cuando se busca su reproducción, sin embargo, dado que el objetivo principal de este estudio no era el de lograr una estrategia de alimentación, quedan al aire muchas preguntas relacionadas con el establecimiento de la técnica, como si los organismos serán capaces de alcanzar la etapa reproductiva y tener descendencia, cuál es el impacto a largo plazo del esfuerzo digestivo en el crecimiento de los organismos, o cuáles son los intervalos de tiempo en los que se puede aplicar esta técnica sin que se presente un efecto perjudicial mayor. Estas preguntas y la búsqueda de sus respuestas, proponen una línea de investigación en torno a la implementación de una técnica de alimentación para el camaricultivo, basada en los resultados de este estudio, es decir, en la manipulación del esfuerzo digestivo que se logra mediante la alternación del origen proteico de las dietas.

### 6.3 Características de las proteínas vegetales

Debido a las ventajas del uso de las fuentes proteicas vegetales antes presentadas, éstas han sido objeto de estudio de muchas investigaciones.

Las principales diferencias de las proteínas animales y las vegetales se refieren a que las primeras están asociadas a una aportación completa de aminoácidos y a una mayor aceptación de las dietas dado que son más atractivas y palatables, mientras que las segundas parecen no aportar todos los aminoácidos esenciales del camarón y presentan factores antinutricionales (Cruz-Suárez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 1996).

Dichos factores antinutricionales pueden ser disminuidos mediante varias técnicas. Rehman y Shah (2005) realizaron un estudio, en donde compararon los efectos de diferentes métodos de cocción sobre los factores antinutricionales y la digestibilidad proteica en varias especies de legumbres. En dicho estudio se encontró que sometiendo a las diferentes legumbres a procesos de cocción, los antinutrientes se ven disminuidos y la digestibilidad proteica aumenta de manera considerable.

Para la elaboración de las dietas utilizadas en nuestro experimento, el alimento fue sometido a un proceso de cocción a 60° C durante 10 h., considerando que con este tratamiento se reduciría el nivel de antinutrientes. Por otro lado, las dietas se llevaron a cabo con concentrados proteicos de las fuentes vegetales, ya que mediante el procesamiento de concentración proteica no solo se asegura una mayor disponibilidad de proteína, sino que también contribuye en la reducción de los compuestos antinutricionales que la cocción no es capaz de remover (Drew *et al.*, 2007).

Habiendo utilizado estas técnicas para la disminución de los antinutrientes inherentes a la proteína vegetal y para el aumento de su digestibilidad, consideramos que se favoreció el aporte proteico de la dieta vegetal, mediante mecanismos que no tienen un gran costo, por lo que su utilización en grandes condiciones es aplicable.

#### 6.4 Evaluación fenotípica de la tripsina

El peso molecular reportado para las isoformas de la tripsina obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida presenta ligeras variaciones. Sainz *et al.* (2004a), reporta pesos de 23, 22 y 21 kDa; Muhlia-Almazan y García-Carreño (2002) reportan pesos de 22.0, 20.7, 19.4 y 17.7 kDa y Cordova Murueta *et al.* (2004) reportan pesos de 23, 21 y 19 kDa, por citar algunos. En el presente estudio, obtuvimos bandas con pesos de 20, 19, 18 y 14.5 kDa y dado que su patrón de aparición coincide con el presentado por los estudios mencionados, presumimos que éstas bandas corresponden a isoformas de tripsina.

En 1996, Klein *et al.* mediante el análisis bioquímico y molecular del hepatopáncreas, determinó que la tripsina en *Litopenaeus vannamei* presenta un alto grado de polimorfismo. En su estudio, encontró 5 secuencias de ADN clonado (cADN) correspondientes a 5 isoformas de tripsina a las que denominó variantes 40, 21, 39, 30 y 42 y las caracterizó en 2 genes (try Pv I y try Pv II). Al realizar electroforesis de proteínas de las muestras de hepatopáncreas, encontró a 3 de las 5 isoformas.

Sainz *et al.* (2004a) purificó y caracterizó mediante parámetros bioquímicos, moleculares y cinéticos, tres isoformas de tripsina, las cuales coinciden con las variantes 30, 21 y 39 ó 40 propuestas por Klein *et al.* (1996). Estas isoformas fueron nombradas A (21 kDa), B (22 kDa) y C (23 kDa) según el aumento de su peso molecular. La banda de menor tamaño encontrada en el presente trabajo, se encuentra reportada solamente en el trabajo de Muhlia-Almazan y García-Carreño (2002).

En 1998, Klein *et al.* mediante el análisis de ADN obtenido de células espermáticas de *Litopenaeus vannamei*, obtuvo las secuencias de tres genes de tripsina, dos de las cuales corresponden a las secuencias de cADN encontradas previamente por la misma autora (1996) en muestras de hepatopáncreas. Dentro de las explicaciones para el hecho de que la tercera secuencia no hubiera sido ubicada anteriormente, plantea las posibilidades de que dicha secuencia se exprese en un estadio de vida distinto al estudiado, o que la presencia de éste mensajero sea una respuesta a factores externos como la naturaleza de la proteína contenida en el alimento.

Sumando la propuesta de regulación debida a las características del alimento de Klein *et al.*, (1998), con el hecho de que Sainz *et al.*, (2004a) no encontrara una isoforma que se acoplara a la variante 42, y aunado a que en el trabajo de Muhlia-Almazan y García-Carreño (2002) se reportara la presencia de 4 bandas parálogas de tripsina, presumimos que la cuarta banda corresponde a una isoforma de tripsina, la cual denominamos A', para evitar una confusión con el orden propuesto por Sainz (2004a).

Debido a la importancia de la tripsina en el proceso de digestión, la regulación de su expresión ha sido estudiada en varias especies. Noriega *et al.* (1997) reportó que las hembras del mosquito de *Aedes aegyptii* regulan la síntesis de dos isoformas de mARN mediante la hormona juvenil. Rungruangsak-Torrissen ha realizado diversos estudios sobre la influencia de diferentes factores ambientales en la regulación de las isoformas de la tripsina del salmón del Atlántico, *Salmo salar*. En 1998, encontró que la temperatura en la cual ocurren la incubación y el comienzo de alimentación afecta la expresión de las isoformas de la tripsina, por lo que dicho patrón es un factor primario para la conversión alimenticia y el crecimiento. Contando con estos antecedentes, diversos investigadores enfocados a la acuicultura se han dado a la tarea de evaluar las diferencias en la expresión de las isoformas de la tripsina como una consecuencia del tipo de dieta con la que se alimenta a los camarones.

Uno de los primeros estudios realizados en camarones en torno a las isoformas de la tripsina fue el de Le Moullac, *et al.* en 1994. En este experimento se analizó el efecto de diferentes porcentajes de Caseína en la dieta (25 y 48%) en organismos de la especie *Litopenaeus vannamei* alimentados una vez al día durante 20 días. No se encontraron diferencias en la expresión de la tripsina asociadas a la dieta, mas es importante considerar que no todas las variables obtienen como resultado la misma respuesta y una explicación a que no se sintetice una isoforma distinta puede basarse en que las condiciones a las que fueron sometidas los individuos durante el experimento no fueron las adecuadas.

Posteriormente en 2002, Muhlia-Almazan y García-Carreño analizaron el efecto de la muda y el ayuno. El trabajo constó de dos experimentos. En uno de ellos, se evaluaron los efectos del estadio de muda y del ayuno hasta por 5 días y en el otro se evaluaron los efectos del ayuno a corto plazo, partiendo desde a 0.5 a 48 horas. A pesar

de que no se encontró una correlación entre el número de bandas, el estadio de muda y el tiempo de ayuno en ninguno de los dos experimentos, llama la atención que la isoforma de menor tamaño, presumiblemente A' solamente apareció en los fenotipos de los individuos sometidos al experimento de ayuno a largo plazo. Los autores del artículo plantean que el cambio en el número de bandas sugiere que la presencia de las isoformas de tripsina de los camarones depende de las necesidades del organismo para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas.

Dado que las isoformas de la tripsina están asociadas con una digestión diferencial (Sainz *et al.*, 2004a), y que la isoforma A' solo se presentó en los organismos que alguna vez ingirieron dieta Vegetal, nuestros resultados sugieren de la misma forma que los obtenidos por Muhlia-Almazan y García-Carreño, que el cambio en el número de bandas, es decir, la síntesis de esta isoforma en los tratamientos que ingirieron dieta Vegetal, surge como una respuesta a la necesidad de digerir o hidrolizar dicha proteína.

Sainz *et al.*, (2005), estudió la modulación de la aparición de las isoformas A, B y C en relación con el ciclo de muda, la actividad enzimática y bajo el efecto de dos dietas comerciales y observó que estos factores no afectan en su aparición. Mediante la comparación de las isoformas presentes en progenitores y sus respectivas descendencias, determinó que las isoformas A, B y C se segregan de manera mendeliana, con lo que el autor concluye que los factores internos y externos no alteran la expresión fenotípica de la enzima.

La segregación mendeliana de los alelos descrita por Sainz *et al.*, (2005), no se contrapone con el efecto modulador de la dieta vegetal, ya que la expresión de la isoforma A' surgió como respuesta a un factor que no se contempló en su trabajo. En trabajos posteriores sería interesante estudiar la segregación alélica de las isoformas de la tripsina, sometiendo a los organismos a una dieta con proteína vegetal, para de esta manera evaluar la segregación del alelo de la cuarta isoforma.

El diseño experimental del presente trabajo permitió retomar elementos de las publicaciones anteriores y considerarlos en conjunto, para de esta manera no solamente evaluar el efecto del origen de la fuente proteica sino tomando en cuenta distintos factores como el seguimiento de la respuesta en las etapas de postlarva y juvenil.

La relación del nivel de transcritos de tripsina (mARN) con la actividad enzimática específica de la misma, ha sugerido que su regulación ocurre de manera transcripcional (Klein *et al.*, 1996 y Sainz *et al.*, 2005), sin embargo, se plantea, debido a la rápida respuesta de traducción de los transcritos, que exista también una regulación post-transcripcional (Sanchez Paz *et al.*, 2003). Ambos niveles de regulación dejan la puerta abierta para la explicación de la presencia de la isoforma A'.

Una de las ventajas de analizar las características fenotípicas de los organismos, en este caso la presencia de isoformas de tripsina, es la de estar evaluando el efecto último de las condiciones experimentales, como pueden ser los efectos de la dieta. A pesar de que el mARN da una idea de la síntesis “potencial” del producto de un gen particular, no existe una relación estricta entre el mARN y la proteína sintetizada. Es decir, que tener una secuencia transcrita, no necesariamente implica tener una proteína funcional en la célula y por lo tanto conocer el fenotipo (Sanchez Paz *et al.*, 2003; Sainz *et al.*, 2005).

Un aspecto importante del presente estudio, se refiere a que no sólo nos basamos en las enzimas presentes en el hepatopáncreas, sino que ya que debido a su naturaleza hidrolítica, las enzimas digestivas se sintetizan como zimógenos, también analizamos la presencia de las isoformas activas. Esto se logró gracias a la técnica de incubación del gel de electroforesis en un sustrato (García-Carreño, 1993), por lo que evaluamos los efectos de las dietas considerando no solo la regulación transcripcional y traduccional, sino también los controles postraduccionales, es decir, la activación del tripsinógeno.

En estudios posteriores sería muy interesante hacer un seguimiento de la expresión de las isoformas en individuos a lo largo del tiempo y conforme se invierte la dieta. Esto se puede lograr con la técnica propuesta por Cordova Murueta *et al.* (2004), en la cual las muestras para la electroforesis son obtenidas a partir de las heces de los individuos, por lo que se vuelve innecesaria la extracción del hepatopáncreas y por ende la muerte del organismo, otorgando la posibilidad de analizar las variaciones de su fenotipo a lo largo de todo el experimento.



Arena *et al.*, (2003) mediante el estudio del efecto de la domesticación en la capacidad de asimilar los carbohidratos de *Litopenaeus vannamei*, descubrió que la frecuencia alélica en las formas de la amilasa no es la misma en distintas generaciones de cultivo, disminuyendo en relación a poblaciones silvestres, la enzima encargada de digerir los carbohidratos del hepatopáncreas, la  $\alpha$ -amilasa, se hacen menos frecuentes en relación con el aumento del grado de domesticación. Esto se debe a que en las dietas utilizadas en los sistemas de cultivo, los carbohidratos se incluyen en muy bajas proporciones, y es el contenido de proteínas lo que fija ciertas características por lo que la importancia para los individuos de la presencia de la  $\alpha$ -amilasa disminuye.

Apoyados en lo anterior, proponemos que el factor que regula la presencia de los alelos de la tripsina, es el tipo de alimento que se encuentra en el hábitat de los individuos, y que estos tienen un amplio espectro de respuesta, con la posibilidad potencial de digerir distintas fuentes de alimento, por lo que la disponibilidad del tipo de alimento del área en el que se desarrollan, influye directamente en la fijación de los alelos, favoreciendo a un fenotipo determinado.

En estudios posteriores sobre esta misma línea de investigación, la purificación y caracterización de la isoforma A' permitirá comparar sus características con las de las isoformas A, B y C, analizar su relación, y posiblemente determinar si su activación representa o no una ventaja en la hidrólisis de la proteína vegetal.

## 7. Conclusiones

Los efectos referentes al crecimiento y la actividad enzimática de las dietas con fuentes de proteína animal y vegetal, administrados en la etapa juvenil a los organismos de la especie *Litopenaeus vannamei*, se encuentran directamente afectados por la fuente de proteína en la dieta con la que los individuos son alimentados en la etapa postlarval. La supervivencia de los organismos no se ve afectada por las fuentes de proteína utilizada en las dietas, tanto en la etapa postlarval, como en la etapa juvenil.

La dieta con proteína de origen vegetal, induce a un esfuerzo digestivo en los organismos. Los efectos de este esfuerzo, no se observan en la etapa de postlarvas, sin embargo, inducen a valores más bajos de crecimiento y actividad enzimática en la etapa juvenil. Los resultados obtenidos en cada tratamiento, son producto tanto de la combinación de las dietas, como del orden en el que fueron administradas. Esto explica que el tratamiento con un mayor crecimiento haya sido el que consistió en alimentar a los individuos en la etapa postlarval con dieta vegetal y en la etapa juvenil con dieta animal (“VA”), ya que la dieta inicial indujo el esfuerzo digestivo durante la primera etapa, sin embargo, al administrar la dieta animal, dicho esfuerzo indujo a una mejor aprovechamiento del alimento, lo que se reflejó en un mayor crecimiento que el alcanzado incluso por los organismo alimentado con dieta animal durante todo el experimento.

La dieta con proteína de origen vegetal induce a la expresión de cuatro isoformas de tripsina, con pesos moleculares de 20, 19, 18 y 14.5 kDa, a diferencia de la dieta con proteína de origen animal que solamente induce a las tres isoformas de mayor peso. La isoforma de menor peso, nombrada en el presente estudio como A' solamente se encuentra reportada en el trabajo de Muhlia-Almazan y García-Carreño (2002), sin embargo, a diferencia de las otras isoformas, no se ha llevado a cabo su purificación y caracterización.

Dado que la isoforma A' surge como una respuesta a la dieta con proteína vegetal, es posible que el esfuerzo digestivo de los organismos alimentados con esta proteína se encuentre asociado a la presencia de dicha isoforma.

## 8. Bibliografía

Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, R. Keith y P. Walter. 2002. Molecular biology of the cell. Garland Science. Nueva York y Londres

Arena L., G. Cuzon, C. Pascual, G. Gaxiola, C. Soyez, A. Wormhoudt y C. Rosas. 2003. Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *Litopenaeus vannamei* fed with different carbohydrate levels. Journal of Shellfish Research. Vol. 22 No. 1. 269-279

Ayala F. y J. Kiger. 1984. Genética moderna. Fondo educativo interamericano. España.

Aquacop, Bourgeois B., Cuzón G., 1975, Determination des stades d'intermude chez *Macrobrachium rosenbergii* (Caridae) and *Penaeus merguensis* (Penaide), Cnexo/COP, Internal Report, 40pp.

Bianchi G., J. Burgueño, D.F. Abella, G. Garibotto, R. Cáceres, R. Cesar y G. Jones. 2001. Post weaning feeding management and performance of Merino ewes grazing on natural and improved pastures at mating season. Ciencia Rural, Santa Maria. 31: 105-110

Brito A., L. Jiménez-Yan, J. Barrera, N. López, A. Sanchez, G. Cuzon y G. Gaxiola. 2004. Utilización de Fuentes de proteína vegetal y carbohidratos en la nutrición de postlarvas y juveniles tempranos de *Litopenaeus vannamei*, un enfoque bioquímico. En Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie D., Nieto Lopez M.G., Villareal D., Scholz U. y Gonzalez M., 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 de noviembre. Hermosillo, Sonora, México.

Carrillo O. y R González. 1997. Control de la digestión en camarones. IV Simposio internacional de nutrición acuícola, 15-18 de noviembre, La Paz, Baja California Sur, México.

Chang E.S. 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 193: 1-14.

Córdova-Murueta J.H., F.L. García-Carreño, M. A. Navarrete-del-Toro. 2004. Effect of stressors on shrimp digestive enzymes from assays of feces: an alternate method of evaluation. *Aquaculture*. 233: 439-449 .

Cruz Suarez E.1996. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 11-13 de noviembre. Universidad Autonoma de Nuevo León , Monterrey, Nuevo León , México.

Cruz-Suárez L.E., J.S. Antimo-Pérez, N. Luna-Mendoza, M. Tapia-Salazar, C. Guajardo-Barbosa y D Ricque-Marie. 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*. 19-22 de noviembre. Mérida, Yucatán.

Cuzon G., C. Rosas, G. Gaxiola, G. Taboada, y A. Van Wormhoudt. 2000. Utilization of Carbohydrates By Shrimp. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 de noviembre. Telchac, Mérida, Yucatán.

Cuzon G., A. Lawrence, G. Gaxiola, C. Rosas y J. Guillaume. 2004a. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds .*Aquaculture*. 235: 513–551

Cuzon G., A. Brito, L. Jiménez-Yan, R. Brito, G. García, G. Gaxiola. 2004b. The effects of animal or plant-based diets on energy partitioning in selected ontogenetic stages of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. En Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie D., Nieto Lopez M.G., Villareal D., Scholz U. y Gonzalez M., 2004. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 16-19 de noviembre. Hermosillo, Sonora, México.

Davis D. A. y C.R. Arnold. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* .185: 291–298

Davis A., D.M Smith, J.M. Fox y A. Tacon. 2006a. Reducing shrimp feed costs without compromising nutrition. AQUA 2006, the Annual Meeting of the World Aquaculture Society. 10-13 de mayo. Florencia. Italia.

Davis D. A., E. Amaya, O. Zelaya, J. Venero, H. Quintero y D. Rouse. 2006b. Historical review of feeding protocols for the pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* at Claude Peteet Mariculture Center, Gulf Shores, Alabama. AQUA 2006, the Annual Meeting of the World Aquaculture Society. 10-13 de mayo. Florencia. Italia.

Debusk R., C. Fogarty, J. Ordovas, K. Kornman. 2005. Nutritional Genomics in Practice: Where do we begin?. Journal of the American Diet Association. 105: 589-598.

Dore I. y Frimodt C., 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Ed. Van Nostrand Reinold, EEUU. pp. 174-175

Drew M.D., T.L. Borgeson y D.L. Thiessen. 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in fin fish. Animal Feed Science and Technology. 138: 118-136.

Einen O., T. Morkore, A. M. Bencze y M. Skinlo. 1999. Feed ration prior to slaughter—a potential tool for managing product quality of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). Aquaculture. 178: 149–169

FAO. Acuicultura en América Latina, Informes de pesca No. 159 Vol. 2, Montevideo Uruguay, 1974

Fernandez I., M. Oha, O. Curd y Van Wormhoudt A. 1997. Digestive enzyme activities of *Penaeus notialis* during reproduction and moulting cycle. Comparative biochemistry physiology. 118: 1267-1271

Froystad M.K., E. Lileeng, K. Vekterud, E.C. Valen y A. Krogdahl. 2006. Comparison of intestinal gene expression from atlantic cod fed standard fishmeal and soybean meal, by means of suppression subtractive hybridization. XII International Symposium Fish Nutrition and Feeding. 28 de mayo – 1 de junio. Biarritz, Francia.

García H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG. 1 (2) : 31-41.

García-Carreño F., L. Dimes y N. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytical Biochemistry. 214: 65-69.

Gaxiola G., A. Brito, C. Maldonado, L. Jimenez-Yan, E. Guzman, L. Arena, R. Brito L. Soto y G. Cuzon. 2006. Nutrición y Domesticación de *Litopenaeus vannamei*. Avances en Nutrición Acuícola VIII. Memorias del VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 de noviembre. Universidad Autonoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León , México.

Geiger R. y H. Fritz. 1988. Proteinases and their inhibitors. En: Bergmeyer J. y Grab I.M. Methods of enzymatic analysis Vol. 5. pp 119-124

Gillies P. 2003. Nutrigenomics: The Rubicon of molecular nutrition. Supplement of the journal of The American Dietetic Association. Suplemento 2, Vol. 103, No. 12. S50-S55

Griffiths A., J. Miller, D. Suzuki, R. Lewontin, y W. Gelbart. 1999. Introduction to Genetic Analysis. W. H. Freeman & Co. Nueva York.

Hernández-Cortes P., L. Cerenius, F. García-Carreño y K. Söderhäll. 1999. Trypsin from *Pacifastacus leniusculus* hepatopancreas: purification and cDNA cloning of the synthesized zymogen. Biological Chemistry 380: 499 –501.

Herrera-Silveira J., N. Aranda, L. Troccoli, F. A. Comín y Ch. Madden. 2005. Eutrofización costera en la península de Yucatán. En: Diagnostico Ambiental del Golfo de México. Compiladores: Margarita Caso, Irene Pisanty y Ezequiel Ezcurra. Secretaria del Medio Ambiente, Instituto de Ecología y Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies

Jimenez L.L. 2004. Alimentos amigables con el ambiente y su efecto en el crecimiento, supervivencia y estadio fisiológico de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (Bonne, 1931). Tesis profesional. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tenosique, Tabasco. 69 pp.

Klein B., G. Le Moullac, D. Sellos y A. van Wormhoudt. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. Int. J. Biochemical cell biology. 28: 551-563

Klein B., D. Sellos y A. van Wormhoudt. 1998. Genomic organisation and polymorphism of a Crustacean trypsin multi-gene family. Gene. 216: 123-129.

Kuresh N. y D.A. Davis. 2000. Metabolic requirement for protein by pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.

Le Moullac G., A. Van Wormhoudt y AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus uannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). Aquat. Living Resour. , 7:203-210.

Lemos D. y A. Rodriguez. 1998. Nutritional effects on body composition, energy content and trypsin activity of *Penaeus japonicus* during early postlarval development. Aquaculture. 160: 103-116

Maldonado J.C. 2007. Efectos de alimentos ricos en proteínas vegetales, en la nutrición, fisiología digestiva y balance bioenergético en reproductores y postlarvas de *Litopenaeus vannamei*. Tesis profesional de maestría. Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 69 pp

Martínez C. A., M. C. Chávez, M. A. Olvera, y M. I. Abdo de la Parra. 1996. Fuentes alternativas de proteínas vegetales como substitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11-13 de noviembre. Universidad Autonoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León , México.

Martínez-Córdova L. R.,M. Ezquerro-Brauer, L. Bringas-Alvarado,E. Aguirre-Hinojosa y MdelC. Garza-Aguirre. 2002. Optimización de alimentos y prácticas de alimentación en el cultivo de camarón en el Noroeste de México. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre Cancún, Quintana Roo, México.

Martínez-Córdova L.R. y E. Peña-Messina. 2005. Biotic communities and feeding habits of *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson 1974) in monoculture and polyculture semi-intensive ponds. Aquaculture Research. 36: 1075-1084.

Morris P.C., C. Beattie, B. Elder, J. Finlay, P. Gallimore, W. Jewison, D. Lee, K. Mackenzie, R. McKinney, R. Sinnott, A. Smart y M. Weir. 2003. Effects of the timing of the introduction of feeds containing different protein and lipid levels on the performance and quality of Atlantic salmon, *Salmo salar*, over the entire seawater phase of growth. Aquaculture. 222: 41-65.

Molle G., S. Landau, A. Branca, M. Sitzia, N. Fois, S. Ligios y S. Casu. 1997. Flushing with soybean meal can improve reproductive performances in lactating Sarda ewes on a mature pasture. Small Ruminant Research. 24: 157- 165



Mulhia-Almazan A. y F.L. García-Carreño. 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 133: 383-394

Nelson L. y M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. Nueva York.

Noriega F.G., D. K Shah y M. A Wells .1997. Juvenile hormone controls early trypsin gene transcription in the midgut of *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. 6: 63–66

Paoloni-Giacobino A., R. Grimble y C. Richard. 2003. Genetics and nutrition. *Clinical Nutrition*. Vol. 22 (5) 429-435

Perez Farfante I., Kensley B., 1997, *Panoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Familias and Genera*. *Memories du Museum National D'Historie Naturelle Tome 175*, Paris, France. pp 233.

Ponce M.A. 2007. Aplicación de la técnica de despliegue diferencial para evaluar el efecto regulador de la dieta en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis Profesional de Licenciatura. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. 62 pp.

Randall D., W. Burggren y K. French. 2002. *Eckert Animal Physiology*. W.H. Freeman. E.U.A.

Rehman Z. y W.H. Shah. 2005. Termal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*. 91: 327-331

Reynaud E. 2001. La punta del iceberg. ¿Cómo ves?. 37: 22-26

Rosas C., G. Cuzon,,G. Gaxiola, C. Pascual,R. Brito, M. Chimal y A. Van Wormhoudt. 2000. El Metabolismo de los Carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 de noviembre. Mérida, Yucatán.

Rosas C. Sánchez, A. Chimal, E. Brito, R. 2003. Manual de Métodos para la Evaluación del Balance Energético en Crustáceos. Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental. Facultad De Ciencias, UNAM

Rungruangsak-Torrissen K., G.M. Pringle, R. Moss y D. F. Houlihan. 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiology and Biochemistry. 19: 247–255.

SAGARPA. 2005. Boletín noviembre. Num. 329/05. México D.F. <http://www.sagarpa.gob.mx>

Sainz J. C., F. L. García-Carreño y P. Hernández-Cortéz. 2004a. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology. 138: 155-162.

Sainz J. C., F. L. García-Carreño, A. Sierra-Beltrán y P. Hernández Cortés. 2004b. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Crustacean Biology. 24(2): 266-273

Sainz J. C., F. L. García-Carreño, J. H. Córdova-Murueta y Pedro Cruz-Hernández. 2005. Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 326: 105–113

Sanchez-Paz A., F. García-Carreño, A. Mulhia-Almazan, N.Y. Hernández-Saavedra y G. Yepiz-Plascencia. 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the White shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 292: 1-17

SEP. 2005. Molecular Biology. The Metaphysics Research Lab Center for the Study of Language and Information. Universidad Stanford. <http://plato.stanford.edu/entries/molecular-biology>

Smith L., J. Fox, G. Treece, J. McVey. 1993. Intensive Larviculture Techniques. CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture. Vol. 1: 153-172

Sormunen-Cristian R, L. Jauhiainen. 2002. Effect of nutritional flushing on the productivity of Finnish Landrace ewes. Small Ruminant Research. 43: 75–83.

Stubhaug I., D.A.Nanton, E. Mykkeltvedt, B. Ruyter, H. Sundvold y B.E. Torstensen. 2006. Gene expression in various atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissues fed either 100% fish oil or 100% plant oil blend. XII International Symposium Fish Nutrition and Feeding. 28 de mayo – 1 de junio. Biarritz, Francia.

Sudaryono A., M. J. Hoxey, S. G. Kailis y L. H. Evans. 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon* . Aquaculture. 134: 313-323

Suresh A.V. 2006. Shrimp feed cost reduction. Aqua Feeds: Formulation & Beyond, Vol. 3 Issue 1. 15-18

Tacon A., S. Nates y McNeil R. 2004. Dietary feeding strategies for shrimp: a review. En Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie D., Nieto Lopez M.G., Villareal D., Scholz U. y González M., 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 de noviembre. Hermosillo, Sonora, México.

Torstensen B.E., A-E. Jordal y O. Lie. 2006. Liver lipid, plasma lipoproteins and expression of fatty acid binding proteins (FABP'S) in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – Effects of complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend. XII International Symposium Fish Nutrition and Feeding. 28 de mayo – 1 de junio. Biarritz, Francia.

Underwood A., 1997. Experiments in Ecology. Cambridge university press. RU. pp 504

Van Wormhoudt A. y P. Favrel. 1988. Electrophoretic characterization of *Palaemon elegans* (Crustacea, Decapoda)  $\alpha$ - amylase system: study of amylase polymorphism during the intermolt cycle. Comparative Biochemistry Physiology. Vol. 89B. No. 2. 201-207.

Van Wormhoudt A., G. Le Moullac, B. Klein y D. Sellos.1996. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda): Adaptación a la composición del régimen alimenticio. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11-13 de noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León , Monterrey, Nuevo León , México.

Venter J.L. y Greyling J.P.C. 1994. Effect of different periods of flushing and synchronized mating on body weight, blood glucose and reproductive performance in spring-mated ewes. Small Ruminant Research. 13: 257-261

Wickins J. y D. Lee. 2002. Crustacean Farming, Ranching and Culture. Ed Blackwell Science. ed. 2. Inglaterra, pp.417

## Anexo

### 1.-Gel de poliacrilamida al 12%

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen (ml)</u>
Agua bidestilada	1,6
Acrilamida/bisacrilamida 30%	2,0
Tris 1,5 m pH 8,8	1,3
SDS 10%	0,05
Persulfato de amonio 10%	0,025
TEMED	0,0025

### 2.- Acrilamida al 30%

<u>Reactivos</u>	<u>Concentración final</u>
Acrilamida	29,2%
Bisacrilamida	0,8%
Mezcla total 30	30%

### 3.- Buffer Tris 1,5 m ph= 8,8

Pesar 181,65 g de tris base y enrasar con agua bidestilada hasta un volumen de 1 L. Ajustar a pH= 8,8 con HCl.

### 4.-Persulfato de Amonio (aps 10%)

Pesar 100 mg y diluir en un volumen final de 1 mL con agua tridestilada. Esta preparación debe ser de 1 semana de antigüedad como máximo.

### 5.-SDS 10%

Disolver 10 g de SDS en 80 mL de agua bidestilada, una vez disuelto se lleva a pH 7,2 con NaOH, finalmente se completa hasta 100 mL con agua bidestilada.

#### 6.-Azul de Bromofenol

Mezclar 500µl de Buffer 8.8 (Tris-Glicina-SDS), 500 µl de glicerol al 50% y una punta de espátula de azul de Bromofenol.

#### 7.-Solución madre de azul de Comasie R250

Disolver 0,25 g de azul brillante de coomasie R250 en 90 mL de metanol:H<sub>2</sub>O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial. Filtrar la solución a través de un papel Whatman N°1 para eliminar los residuos extraños. Antes de usar dejar en reposo por una semana en un frasco oscuro.

#### 8.- Solución de decoloración rápida

Mezclar 10 mL de ácido acético glacial con 50 mL de metanol. Llevar la solución a 100 mL con 40 mL de agua destilada.