



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA, COMPOSICIÓN  
BIOQUÍMICA Y EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS EN LARVAS DE CAMARÓN  
*LITOPENAEUS VANNAMEI* ALIMENTADAS CON EL  
NEMATODO *PANAGROLAIMUS* SP., USANDO DOS  
DENSIDADES Y DOS FRECUENCIAS DE ALIMENTACIÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**MRIYA MICHELE CELESTE LÓPEZ GALICIA**

**ASESORES:**

**MVZ EPA Luis Andrés Castro Fuentes**

**Dra. Laurence Stéphanie Mercier**

**Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

**2020**



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.

## DEDICATORIA

A mi persona.

A mi madre Ma. de los Angeles Galicia Cortés

A mi padre Rodrigo López Medina

Gracias por hacer de mi la persona que soy...



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de personas e instituciones para su realización.

Agradezco al proyecto SEP-CONACYT (No.220642) por financiar esta investigación, así como a la empresa E-Nema (Alemania) por la producción del nematodo *Panagrolaimus* sp. y a la empresa Blue Genetics de México SA de CV por donar los nauplios de *L. vannamei*.

Agradezco al CIBNOR y al Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola, así como al Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos por todas las facilidades otorgadas para el uso de sus instalaciones y equipo.

Agradezco infinitamente y especialmente a la Dra. Laurence Mercier, por depositar su confianza en mí, instruirme y apoyarme siempre que lo necesite; por hacerme crecer como persona y como profesionista. Este trabajo de investigación no hubiese sido posible sin usted.

A la Dra. Norma Estrada, por su asesoramiento en la parte técnica de expresión de genes, por compartir su conocimiento, paciencia y tiempo conmigo.

Al Dr. Mario Rojas, por su tutela, recomendaciones y amistad durante este proceso.

Al Dr. Andrés Castro, por su asesoramiento, sugerencias y motivación.

A la técnico del Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola, Sandra de la Paz, por brindarnos su apoyo y conocimiento técnico para el uso de las instalaciones en las que se realizó el bioensayo. De igual forma agradezco a los técnicos Julián Garzón y Adriana Green por proporcionarnos la microalga necesaria para dicho bioensayo.

Al técnico Julio Hernández del Laboratorio de Biología Molecular en Plantas, por dejarnos usar algunos equipos y por auxiliarnos con su experiencia técnica durante el proceso de obtención de ARN. Al técnico Roberto Hernández del Laboratorio de Bioquímica

Fisiológica, por ayudarnos y supervisar el procesamiento de las muestras para los análisis bioquímicos, así como su lectura y a la técnico Gabriela Mendoza Carrión del Laboratorio de Bioinformática Genética, por apoyarnos en el procesamiento de las muestras para los análisis de expresión génica.

Al Dr. Humberto Mejía, Dr. Ricardo Vázquez y al Dr. Dariel Tovar, por facilitarnos el uso de las instalaciones y equipos de los Laboratorios de Bioinformática Genética y de Fisiología Comparada y Genética Funcional.

Un agradecimiento muy especial para Julio Ayala, por ser mi colaborador técnico en el bioensayo, por instruirme con su experiencia, por brindarme su amistad, paciencia y confianza.

A mis amados padres Ma. De los Angeles Galicia Cortés y Rodrigo López Medina, por brindarme su apoyo, comprensión, confianza, cariño y amor en todo momento.

A mis hermosas hermanas Desireth y Florence por su constante motivación, amor y ejemplo profesional y personal.

A mi querida amiga y confidente Carla Muñoz, por su tiempo, paciencia, cariño, alegría, compañía y confianza. ¡Gracias por hacer más amena mi estadía en la ciudad de La Paz!

A mi amigo, hermana gemela y compañero de travesuras en el laboratorio Ismael Mendoza, por sus consejos, comprensión, alegría, risas y cariño.

A mis queridos amigos Beto Espinosa, Fer Sandoval, Quitzé Vivanco, Roy Díaz, Criss Tapia y Dulce Ramírez por sus constantes porras y cariño a la distancia.

A mi amigo y pareja JuMa Beltrán, por su amor, disposición, comprensión, alegría y motivación constante. ¡Gracias por creer en mí y no dejarme desistir!!!

## CONTENIDO

	Página
<b>DEDICATORIA</b> .....	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	III
<b>CONTENIDO</b> .....	V
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VII
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	IX
<b>ABREVIATURAS</b> .....	X
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>ANTECEDENTES</b> .....	4
El camarón blanco del Pacífico.....	4
Desarrollo larvario.....	5
La <i>Artemia</i> .....	8
Los nematodos.....	9
Ontogenia del sistema digestivo en larvas de <i>L. vannamei</i> .....	12
La expresión génica de enzimas digestivas.....	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	16
<b>HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	18
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	19
Bioensayo.....	19
Conteo de la microalga <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	20
Conteo de nematodos.....	21
Eclosión, cosecha y conteo de <i>Artemia</i> .....	21
Revisión de larvas y de parámetros fisicoquímicos del agua.....	22
Muestreo.....	22
Análisis de muestras.....	23
Análisis bioquímicos.....	23
Determinación de proteínas totales.....	23
Determinación de lípidos totales.....	23
Determinación de glucógeno.....	24
Determinación de carbohidratos totales.....	24
Análisis de expresión génica.....	25
Extracción de Ácido Ribonucleico (ARN).....	25

Síntesis de ADN complementario (ADNc) .....	25
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis .....	25
Selección de genes de enzimas digestivas y diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real .....	26
Curvas de calibración y PCR en tiempo real (qPCR) .....	27
Análisis estadísticos .....	28
<b>RESULTADOS</b> .....	30
Calidad del agua.....	30
Desempeño zootécnico de las larvas.....	30
Composición bioquímica de las larvas.....	34
Corroboración por medio de los geles de agarosa de la síntesis de ADNc y diseño de oligonucleótidos.....	36
Análisis de la expresión génica de las enzimas digestivas.....	37
<b>DISCUSIÓN</b> .....	44
Desempeño zootécnico de las larvas.....	44
Composición bioquímica y estado nutricional de las larvas .....	46
Expresión génica de las enzimas digestivas.....	48
<b>CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>REFERENCIAS</b> .....	51
<b>ANEXOS</b> .....	65
1. Guía para la obtención de arn utilizando el KIT FastRNA progreen (MP Biomedicals®) .....	65
2. Guía para la conversión de arn en ADNc empleando al kit IMPROM-II™ reverse transcription system (Promega®).....	67
3. Secuencias génicas de los oligonucleótidos empleados para la evaluación de la actividad de las enzimas digestivas .....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1.	Ciclo biológico de un camarón peneido.	4
Figura 2.	Desarrollo larvario de un camarón peneido.	5
Figura 3.	Nauplio V (N.V) de <i>L. vannamei</i> .	5
Figura 4.	Etapa protozoéal de <i>L. vannamei</i> .	6
Figura 5.	Etapa de mysis de <i>L. vannamei</i> .	7
Figura 6.	Postlarva I de <i>L. vannamei</i> .	7
Figura 7.	Nauplio de <i>Artemia</i> .	8
Figura 8.	<i>Panagrolaimus</i> sp.	10
Figura 9.	Estómago de PL.I de <i>L. vannamei</i>	13
Figura 10.	Esquema de la distribución de las unidades experimentales del bioensayo.	20
Figura 11.	Interacción de la dieta y frecuencia de suministro en la longitud total (mm) de las larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	32
Figura 12.	Interacción de la dieta y frecuencia de suministro en el peso seco (mg) de las larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	33
Figura 13.	Efecto de la dieta en la concentración de glucógeno (mg/g peso seco) en Larvas de <i>L. vannamei</i> .	35
Figura 14.	Gel de agarosa al 1.0% teñido con GelRED empleando el gen constitutivo LvRPL8 856bp para corroborar la obtención de ADNc.	36
Figura 15.	Gel de agarosa al 1.0 % teñido con GelRED empleando los genes constitutivos B-Tubulina y factor de elongación 1- $\alpha$ , al igual que los genes de las enzimas digestivas.	36
Figura 16.	Expresión relativa del gen de la amilasa en PL.I de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>Panagrolaimus</i> sp. suministrado a dos densidades y frecuencias.	38

Figura 17.	Expresión relativa del gen de la lipasa en PL.I de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>Panagrolaimus</i> sp. suministrado a dos densidades y frecuencias.	39
Figura 18.	Expresión relativa del gen de la tripsina en PL.I de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>Panagrolaimus</i> sp. suministrado a dos densidades y frecuencias.	40
Figura 19.	Expresión relativa del gen de la quimotripsina en PL.I de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>Panagrolaimus</i> sp. suministrado a dos densidades y frecuencias.	41
Figura 20.	Expresión relativa del gen de la catepsina en PL.I de <i>L. vannamei</i> alimentadas con <i>Panagrolaimus</i> sp. suministrado a dos densidades y frecuencias.	42

---

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
Cuadro 1.	Clasificación taxonómica del camarón blanco del Pacífico.	4
Cuadro 2.	Protocolo de alimentación larvaria.	20
Cuadro 3.	Secuencias génicas de los oligonucleótidos.	27
Cuadro 4.	Parámetros fisicoquímicos en el agua de cultivo durante el bioensayo.	30
Cuadro 5.	Desempeño zootécnico de las larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante el bioensayo.	31
Cuadro 6.	Composición bioquímica de las larvas de <i>Litopenaeus vannamei</i> durante el bioensayo.	34
Cuadro 7.	Matriz génica de significancia estadística $P < 0.05$ y $P > 0.05$ de las enzimas amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina y catepsina en las dietas de 100% Nematodos y 75% Nematodos + 25% <i>Artemia</i> .	43

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARA</b>	Ácido araquidónico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>Cel</b>	Célula
<b>Cp</b>	Ciclo umbral para lectura de fluorescencia
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>OD</b>	Oxígeno disuelto
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>g</b>	Gramo
<b>GADPH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>L</b>	Litros
<b>LvEF1A</b>	Factor de elongación 1- $\alpha$
<b>LvRPL8</b>	Proteína ribosomal L8
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>min</b>	Minuto
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mL</b>	Mililitro
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrómetro
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
<b>pH</b>	Potencial iones de hidrogeno
<b>%</b>	Porcentaje
<b>REST</b>	Relative expression software tool
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundo
<b>TAE</b>	Solución amortiguadora de Tris, ácido acético y EDTA
<b>TCA</b>	Ácido tricloracético
<b>TM</b>	Temperatura de fusión
<b>U/<math>\mu</math>L</b>	Unidades por microlitro
<b>ups</b>	Unidades prácticas de salinidad

## RESUMEN

LÓPEZ GALICIA MRIYA MICHELE CELESTE. Crecimiento, supervivencia, composición bioquímica y expresión génica de enzimas digestivas en larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* alimentadas con el nematodo *Panagrolaimus* sp., usando dos densidades y dos frecuencias de alimentación (bajo la dirección del MVZ EPA Luis Andrés Castro Fuentes, la Dra. Laurence Stéphanie Mercier y la Dra. Norma Angélica Estrada Muñoz).

La escasez y el alto precio de la *Artemia* constituye un problema que amenaza la producción mundial del camarón *Litopenaeus vannamei*. Recientemente, el nematodo *Panagrolaimus* sp. ha mostrado ser un posible sustituto de la *Artemia* en la alimentación larval y postlarval de *L. vannamei*. Dicho nematodo tiene una alta tolerancia a la desecación y contiene naturalmente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA) y puede ser enriquecido con el ácido docosahexaenoico (DHA) usando el dinoflagelado *Cryptocodinium cohnii*. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos densidades de nematodos con dos frecuencias de alimentación en el desempeño zootécnico (longitud total, peso seco, supervivencia y porcentaje de organismos en Postlarva I, PL.I), composición bioquímica (proteínas totales, lípidos totales, carbohidratos totales y glucógeno) y expresión de genes de enzimas digestivas (amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina y catepsina) de larvas de *L. vannamei*. Desde el estadio Zoea II hasta PL.I, tres dietas fueron suministradas usando dos frecuencias de alimentación (1 y 3 veces/día): 1- 100% *Artemia* (A, control); 2- 100% Nematodos (NG); 3- 75% Nematodos + 25% *Artemia* (75NG). Cada tratamiento fue evaluado con tres réplicas. El muestreo se realizó después de 9 días de alimentación. A partir de los resultados, se recomienda alimentar las larvas de *L. vannamei* con 75% nematodos + 25% *Artemia* al menos tres veces al día desde Zoea II hasta PL.I. El suministro una vez al día de 100% *Panagrolaimus* sp. provoca probablemente un mayor desgaste energético en las larvas ya que se observó una sobreexpresión génica de la amilasa, lipasa y quimotripsina.

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos tales como peces, crustáceos, moluscos y plantas de aguas dulces, salobres o saladas (Platas y Vilaboa, 2014; FAO, 2018a). Hoy en día, existen aproximadamente 567 especies acuáticas que se cultivan en todo el mundo. La acuicultura es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento y se ha convertido en una de las mejores opciones para satisfacer la demanda de productos marinos destinados al consumo humano (FAO, 2018a).

El cultivo de camarón o camaronicultura representa una de las actividades acuícolas con mayor expansión a nivel mundial. La producción camaronícola en el mundo sobrepasó 5.1 millones de toneladas en el año 2016, lo cual generó un ingreso de 31.9 millones de dólares americanos (FAO, 2018b). El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) es el crustáceo mayormente producido por la acuicultura. En el 2016, su producción alcanzó aproximadamente 4.1 millones de toneladas con un valor de 24.4 millones de dólares americanos (FAO, 2018b). Dicha producción se concentró principalmente en el continente americano y asiático, particularmente en China, Tailandia, Indonesia, Brasil, México, Ecuador, Venezuela y Honduras, entre otros países (FAO, 2018c).

En México, el cultivo de camarón se inició a partir de los años 80s y la actividad ha tenido un crecimiento exponencial desde entonces. Las actividades de cultivo se concentran en un 82% en el Noroeste del país, principalmente alrededor del golfo de California, en la zona costera de los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit (CONAPESCA, 2017). En el 2016, el cultivo del camarón *L. vannamei* representó el 33.1% de la producción acuícola total nacional, con un volumen de aproximadamente 127 mil toneladas y un valor estimado en más de 11.3 millones de pesos (CONAPESCA, 2016; FAO, 2018b). El crecimiento acelerado de la actividad camaronícola ha sido sustentado por los laboratorios de producción de postlarvas, los cuales realizan la maduración y la cría larval en condiciones controladas. Los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit presentan el mayor número de laboratorios que abastecen a las granjas de engorda de camarón (Industria Acuícola, 2016).

La producción de larvas de *L. vannamei* depende de un buen suministro de *Artemia*, un pequeño crustáceo branquiópodo empleado de manera rutinaria como presa viva en la alimentación larvaria del camarón. Los quistes deshidratados de *Artemia* se venden

comercialmente enlatados y únicamente requieren rehidratarse durante 18 a 24 horas para obtener los nauplios (primer estado larvario de esta presa) y suministrarlos a las larvas de camarón. No obstante, el uso de la *Artemia* presenta varias desventajas como son la variabilidad en su porcentaje de eclosión (Biedenbach *et al.*, 1989), su limitada disponibilidad y alto precio (Silva y Vélez, 2013). Adicionalmente, pueden contener altos niveles de metales pesados, compuestos organoclorados y bacterias potencialmente patógenas para los organismos en cultivo (Léger *et al.*, 1986).

Por lo anterior, desde hace varios años se busca sustituir a la *Artemia* por otra presa de bajo costo, libre de contaminantes y patógenos, y que sea de fácil manipulación. Al respecto, el nematodo *Panagrolaimus* sp. mostró que puede sobrevivir bajo condiciones anhidrobióticas, lo que permite un almacenamiento igual de práctico que el de la *Artemia* (Honnens y Ehlers, 2013). Su talla es ideal para ser consumido por las larvas de camarón y puede ser producido en grandes cantidades, bajo condiciones monoxénicas, de tal manera que no transmite ninguna enfermedad, virus o bacterias no deseadas. Recientemente, la *Artemia* ha sido reemplazada con éxito por *Panagrolaimus* sp. durante los primeros días de cultivo larval y postlarval del camarón blanco del Pacífico (Seychelles *et al.*, 2017; Seychelles *et al.*, 2018). Sin embargo, se necesitan más investigaciones para determinar la densidad óptima de nematodos a suministrar y la frecuencia de alimentación que permita un mayor crecimiento y supervivencia de las larvas, reflejado en su composición bioquímica y en la expresión génica de sus enzimas digestivas.

En el presente trabajo se evaluó el efecto que ejerce *Panagrolaimus* sp., suministrado a dos densidades y frecuencias diferentes, en la expresión génica de enzimas digestivas en larvas de *L. vannamei*. Esta información permitirá incrementar el conocimiento sobre la aceptabilidad de este nematodo y su aprovechamiento nutricional como alimento vivo.

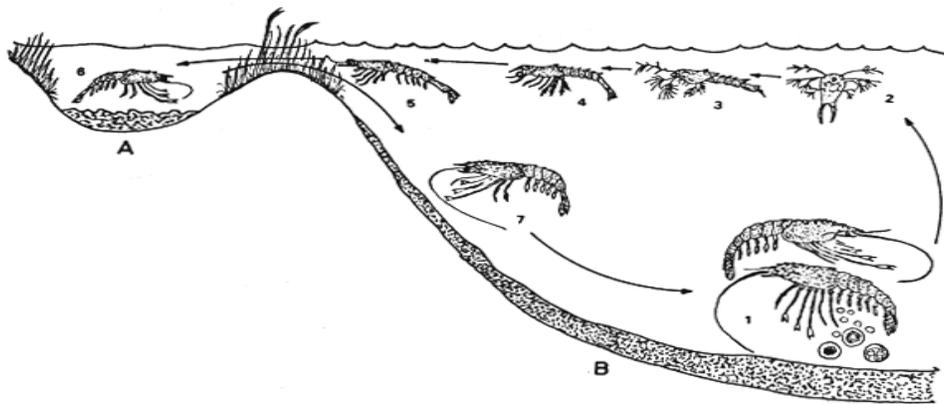
## ANTECEDENTES

### El camarón blanco del Pacífico

El camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, pertenece al gran filo de los artrópodos y forma parte de la familia *Penaeidae* (**Cuadro 1**). Se distribuye de manera natural desde el extremo norte del Golfo de California en México hasta Tumbes en Perú (Méndez, 1981) donde se desarrolla entre dos hábitats. La reproducción de los adultos ocurre en mar abierto mientras que las postlarvas migran hacia aguas interiores como zonas estuarinas y canales de marea, en donde viven hasta los últimos estadios juveniles para luego regresar a aguas oceánicas (**Figura 1**) (Méndez, 1981).

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica del camarón blanco del Pacífico** (Fuente: Pérez-Farfante y Kensley, 1997).

<b>Filo</b>	<i>Arthropoda</i>
<b>Clase</b>	<i>Malacostraca</i>
<b>Suborden</b>	<i>Dendobrachiata</i>
<b>Superfamilia</b>	<i>Penaeoidea</i>
<b>Familia</b>	<i>Penaeidae</i>
<b>Género</b>	<i>Litopenaeus</i>
<b>Especie</b>	<i>vannamei</i>

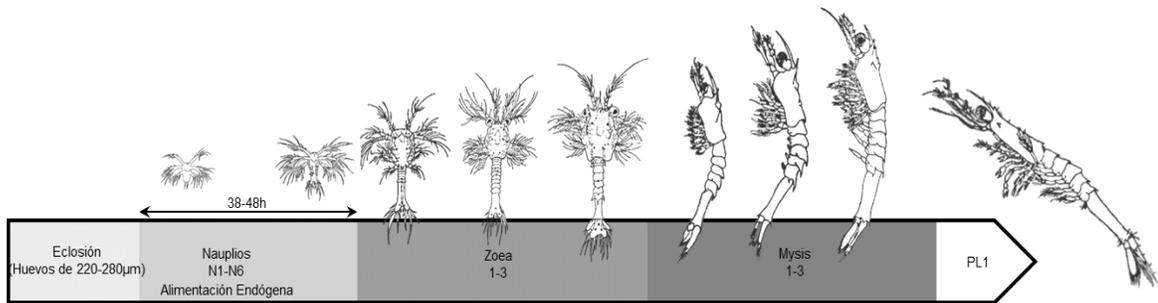


**Figura 1.** Ciclo biológico de un camarón peneido (Fuente: Méndez, 1981).

1. Reproducción y desove de huevos, 2. Etapa naupliar, 3. Etapa protozoal, 4. Etapa de mysis, 5. Etapa postlarval, 6. Camarón juvenil, 7. Camarón adulto. A. Aguas estuarinas, B. Mar abierto.

## Desarrollo larvario

El desarrollo larvario de los camarones peneidos consta de 4 estadios morfológicos: nauplio, protozoea o zoea, mysis y postlarva. Cada etapa larvaria cuenta con varios subestadios y el ciclo larvario tiene una duración de aproximadamente 10 días a partir de la eclosión del huevo fecundado (**Figura 2**) (Treece y Yates, 1993).



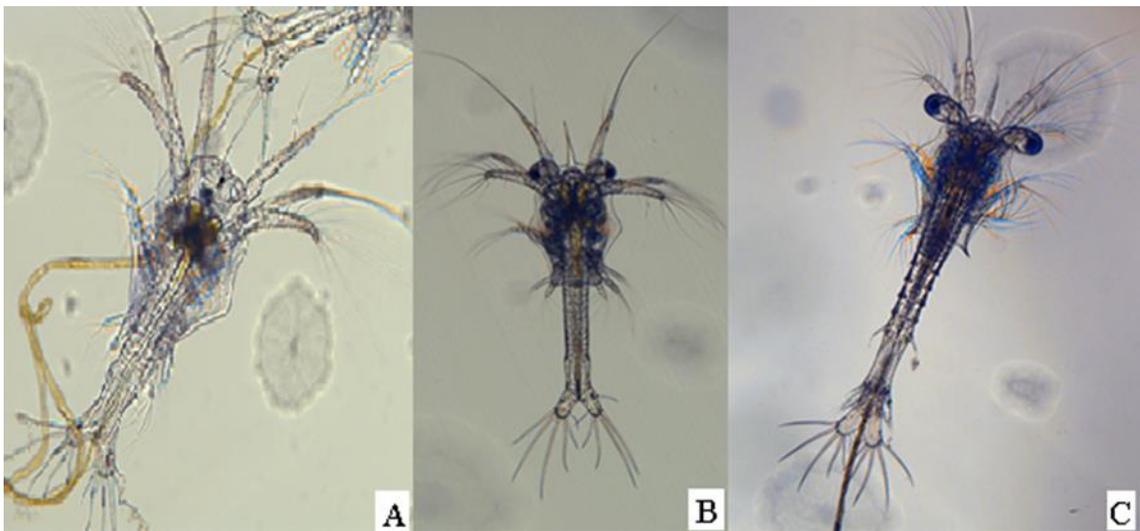
**Figura 2.** Desarrollo larvario de un camarón peneido (Fuente: Modificado de Tabb *et al.*, 1972).

La etapa naupliar consta de 5 subestadios larvarios y tiene una duración de aproximadamente 48 a 50 horas. Los nauplios se alimentan principalmente de su vitelo y cuando se encuentran en el subestadio V (**Figura 3**), el tracto digestivo empieza a distinguirse claramente (Andrade-Viscaíno, 2010). La frecuencia del nado de los nauplios asciende conforme se desarrollan (Treece y Yates, 1993).



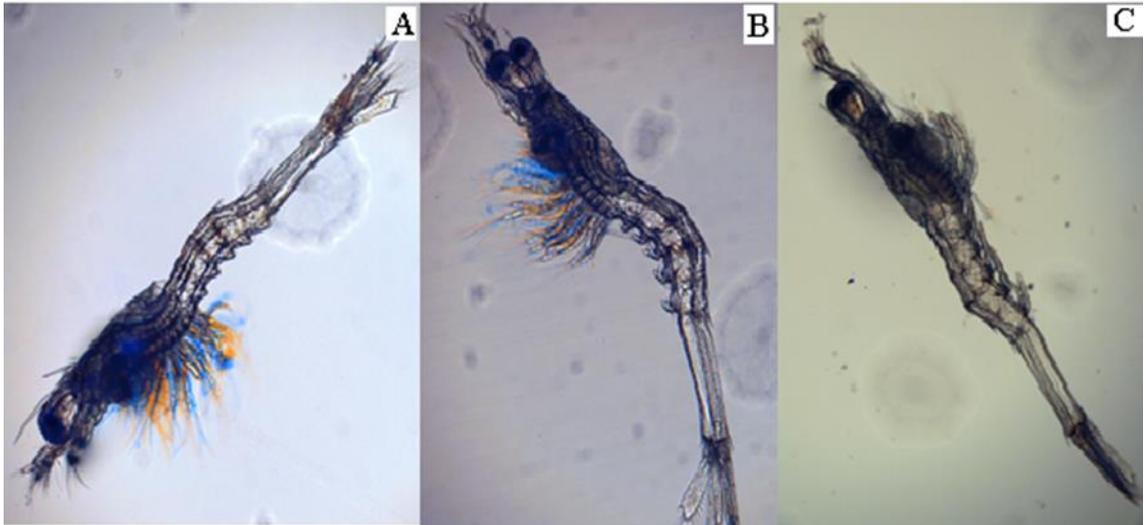
**Figura 3.** Nauplio V (N.V) de *L. vannamei*.

Durante la etapa protozoal o zoeal, hay 3 subestadios larvarios, los cuales duran cerca de 72 a 126 horas (**Figura 4**) (Andrade-Viscaíno, 2010). Esta etapa representa uno de los estadios críticos del desarrollo larvario del camarón ya que las larvas comienzan a alimentarse, principalmente de fitoplancton, además se encuentran nadando continuamente (Treece y Yates, 1993). Morfológicamente, el rostro y los ojos pedunculados se desarrollan e inicia la segmentación del abdomen. También los urópodos se distinguen, aunque no están completamente formados.



**Figura 4.** Etapa protozoal de *L. vannamei*.  
 A. Protozoa I (Z.I), B. Protozoa II (Z.II), C. Protozoa III (Z.III).

La etapa de mysis consta de 3 subestadios larvarios y tiene una duración aproximada de 72 horas (**Figura 5**) (Treece y Yates, 1993). El nado es hacia delante y las larvas permanecen más tiempo en el fondo de la columna de agua (Treece y Yates, 1993). Es a partir de esta etapa que las larvas son alimentadas con nauplios de *Artemia* (Arellano, 1990). Esta etapa se caracteriza por la segmentación y el crecimiento de los pereiópodos y pleópodos (Treece y Yates, 1993). El desarrollo de éstos permite distinguir entre los 3 subestadios.



**Figura 5.** Etapa de mysis de *L. vannamei*.  
A. Mysis I (M.I), B. Mysis II (M.II), C. Mysis III (M.III).

En un lapso aproximado de 24 horas, las larvas Mysis III pasan a ser Postlarva I (PL.I) (**Figura 6**). Esa postlarva tiene la fisonomía de un camarón adulto y generalmente se encuentra al fondo de la columna de agua o puede estar adherida a las paredes de los estanques (Treece y Yates, 1993). Una característica de la PL.I es la presencia de setas de natación en los pleópodos.



**Figura 6.** Postlarva I (PL.I) de *L. vannamei*.

## La *Artemia*

La *Artemia* es un crustáceo branquiópodo que fue descrito desde el siglo XVIII y ha sido ampliamente estudiado a partir del siglo XIX (Persoone y Sorgeloos, 1980). Habita en ambientes hipersalinos, en aguas continentales o costeras alrededor del mundo (Vanhaecke, Tackaert y Sorgeloos, 1987; Triantaphyllidis, Abatzopoulos y Sorgeloos, 1998). Hasta la fecha, nueve especies han sido identificadas con diferentes características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Crespo y Baessolo, 2002): *A. salina*, *A. urniana*, *A. tibetiana*, *A. sp.*, *A. sinica*, *A. parthenogenetica*, *A. monica*, *A. permisilis* y *A. franciscana*.

Los nauplios recién eclosionados de *Artemia* (**Figura 7**) han sido usados desde los años 1930s como alimento para las primeras etapas de la mayoría de las especies de peces y crustáceos marinos (Sorgeloos *et al.*, 1998; Wurtsbaugh y Gliwicz, 2001; Sorgeloos, Dhert y Candreva, 2001). La facilidad con la cual la *Artemia* es producida a partir de quistes almacenables en seco, su composición bioquímica y disponibilidad durante todo el año, la convirtieron durante muchas décadas en un alimento idóneo para la industria acuícola (Léger *et al.*, 1986; Léger *et al.*, 1987; Sorgeloos *et al.*, 1998). La *Artemia* presenta también versatilidad en su tamaño y forma, por lo que puede ser empleada como alimento desde el estadio de nauplio hasta adulta, teniendo una buena palatabilidad como presa (Léger *et al.*, 1987; Tackaert y Sorgeloos, 1993; Guevara y Lodeiros, 2003).



**Figura 7.** Nauplio de *Artemia*.

No obstante, desde los años 1970s se ha buscado sustituir parcialmente o totalmente a la *Artemia* en la alimentación larvaria de peces y crustáceos marinos (Samocha y Lewinsohn, 1977; Fontaine *et al.*, 1982; Wilkenfeld, Lawrence y Kuban, 1984; D´Abramo, 2002). Las grandes fluctuaciones en la producción de quistes y sus precios de venta (Biedenbach *et al.*, 1989; Lavens y Sorgeloos, 2000a; Santiago, Ricci y Reyes-Lampa, 2003; Sautter *et al.*, 2007) así como las variaciones en la eclosión (Biedenbach *et al.*, 1989; Sorgeloos *et al.*, 1998; Lavens y Sorgeloos, 2000b) y la calidad nutricional de los nauplios (Léger *et al.*, 1986; Biedenbach *et al.*, 1989; Webster y Lovell, 1990) han propiciado la búsqueda de otras alternativas. Se ha mostrado también que la *Artemia* puede ser acarreadora de organismos bacterianos y compuestos tóxicos (Léger *et al.*, 1986; Vandenberghe *et al.*, 2003). Por último, las especies de *Artemia* disponibles en el mercado son pobres en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3) y docosahexaenoico (DHA, 20:6n3), los cuales son importantes para la supervivencia y crecimiento de las larvas de peces y crustáceos marinos (Kumlu, Fletcher y Fisher, 1998; Honnens, Assheuer y Ehlers, 2014). A pesar de que la *Artemia* puede ser enriquecida con emulsiones ricas en estos ácidos grasos altamente insaturados, lo que mejora su valor nutricional, el proceso de enriquecimiento dura entre 24 y 48 h y no garantiza que cada *Artemia* tenga la misma composición nutricional (Sorgeloos, Dhert y Candreva, 2001).

### **Los nematodos**

Los nematodos son organismos pluricelulares muy diversos que abarcan miles de especies y pueden habitar en ambientes terrestres y acuáticos. Forman el cuarto filo más grande del reino animal y normalmente son microscópicos. Algunas especies de nematodos se encuentran en los sedimentos de mares y estuarios, siendo alimento para la fauna marina local (Moens y Vincx, 1997).

Desde los años 80s, los nematodos fueron identificados como organismos con un gran potencial para la larvicultura de peces y crustáceos ya que pueden ser producidos rápidamente, usando técnicas muy simples e ingredientes poco costosos que estén disponibles todo el año (Brüggemann, 2012). Además, tienen una pequeña talla y son tolerantes a grandes intervalos de temperatura y salinidad (Brüggemann, 2012). Aunque el valor nutritivo de los nematodos varía en función de la especie y está influenciado por el medio de cultivo, es importante mencionar que su perfil nutricional en proteínas es muy

similar al de la *Artemia* (Kahan *et al.*, 1980; Fontaine *et al.*, 1982; Rouse, Webster y Radwin, 1992).

Uno de los nematodos que ha sido ampliamente estudiado como alimento para larvas de camarones peneidos, así como peces marinos y dulceacuícolas es *Panagrellus redivivus* (Samocha y Lewinsohn, 1977; Biedenbach *et al.*, 1989; Kumlu y Fletcher, 1997; Kumlu, Fletcher y Fisher, 1998). Su alta disponibilidad, buen contenido en proteínas, tamaño pequeño y ciclo reproductivo rápido, así como la facilidad de su cultivo y bajo costo de producción (Wilkenfeld *et al.*, 1984; Palacios y Vega, 1999; Ricci *et al.*, 2003; Luna-Figueroa, 2009) son elementos que lo postularon a ser un posible sustituto de la *Artemia*.

No obstante, uno de las principales limitantes del uso de *P. redivivus* es la incapacidad de almacenarlo deshidratado como la *Artemia* (Honnens y Ehlers, 2013). Recientes investigaciones han demostrado que otra especie de nematodo, como es *Panagrolaimus* sp. (**Figura 8**) si puede sobrevivir bajo condiciones anhidrobióticas, lo que permite un almacenamiento igual de práctico que el de la *Artemia* (Honnens, Assheuer y Ehlers, 2013). La longitud de este nematodo es ideal para ser consumido por larvas, ya que mide entre 170 y 1,370µm aproximadamente (Honnens y Ehlers, 2013). Adicionalmente, este nematodo puede ser pre-enriquecido con ácidos grasos (Honnens, Assheuer y Ehlers, 2014) y enseguida ser deshidratado y almacenado. Recientemente se ha documentado su uso como alimento vivo desde el estadio de Zoea II en larvas de *L. vannamei* (Seychelles *et al.*, 2017; Seychelles *et al.*, 2018; Ayala-Aguilar, 2019).



**Figura 8.** *Panagrolaimus* sp.

Diversos estudios han demostrado que *Panagrolaimus* sp. puede permanecer por un periodo largo en agua marina (Honnens, Assheuer y Ehlers, 2013). Para suministrar este nematodo enriquecido a las larvas, solo se requieren entre dos y tres horas de rehidratación, mientras que en el caso de los quistes de *Artemia*, se necesitan por lo menos dos días para que ésta sea enriquecida. Una ventaja adicional de usar *Panagrolaimus* sp. es que puede producirse en grandes cantidades, bajo condiciones monoxénicas, de tal manera que no transmiten ninguna enfermedad, virus o cultivo de bacterias no deseadas y son libres de contaminantes. Su contenido de proteínas y lípidos es aproximadamente del 40% y 20%, respectivamente (Mercier, comunicación personal). De manera natural, *Panagrolaimus* sp. contiene EPA y ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) (3 y 7% de los ácidos grasos totales, respectivamente) (Honnens, Assheuer y Ehlers, 2014), por lo que requiere ser enriquecido solamente con DHA; mientras que, para el enriquecimiento de la *Artemia*, el contenido de ácidos grasos esenciales es difícil de controlar ya que puede metabolizar el DHA y convertirlo en EPA (Navarro *et al.*, 1999). *Panagrolaimus* sp. puede ser enriquecido en DHA alimentándolo con el dinoflagelado *Cryptocodinium cohnii* (Honnens, Assheuer y Ehlers, 2014), sin requerir el uso de aceite de pescado. Este dinoflagelado tiene una gran capacidad de acumular DHA (de Swaaf, Pronk y Sijtsma, 2003).

### **Ontogenia del sistema digestivo en larvas de *L. vannamei***

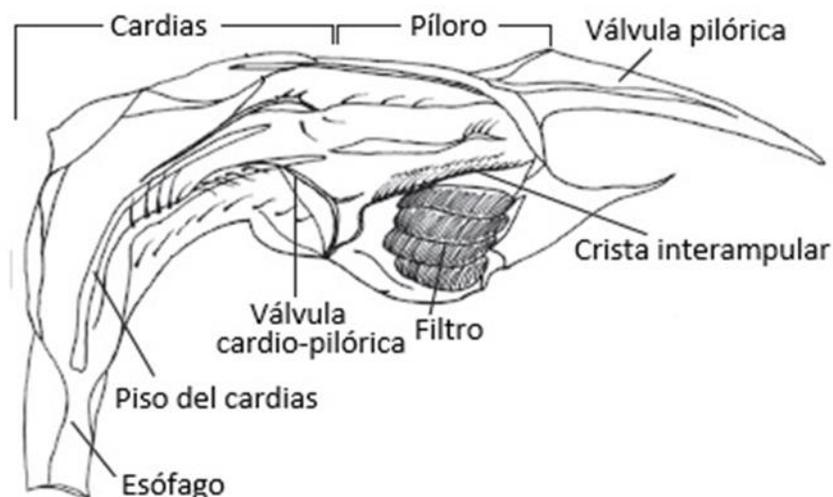
La morfología del sistema digestivo de *L. vannamei* se desarrolla durante los diferentes estadios larvarios y condiciona el proceso de digestión realizado por las enzimas como son la tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasa (Dai *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2014).

En las etapas embrionaria y naupliar, el tracto digestivo ha sido descrito como un tubo simple y el esófago es un canal entre la boca y el intestino anterior (estomodeo). El intestino medio (mesenterón) se define hasta el último subestadio naupliar (Muhammad *et al.*, 2012) y la actividad génica de las enzimas digestivas es baja en estas dos etapas (Wei *et al.*, 2014).

A partir de la etapa protozoal, las larvas consumen microalgas o restos de plantas acuáticas. El tracto digestivo consta del esófago, estómago simple y del intestino medio que tiene lóbulos alargados (Abrunhosa y Melo, 2008; Muhammad *et al.*, 2012). En dicha etapa, se ha registrado una alta actividad génica de la tripsina, quimotripsina y amilasa (Wei *et al.*, 2014); las dos primeras trabajan en conjunto para la digestión de las proteínas provenientes del alimento (Galgani, Benyamin y Van Wormhoudt, 1985; Tsai, Chuang y Chuang, 1986; Van Wormhoudt *et al.*, 1999) y la última está involucrada en el catabolismo del glucógeno (Van Wormhoudt *et al.*, 1999).

Las larvas en el estadio de mysis y postlarval temprano se alimentan principalmente de presas vivas. El estómago de las M.III consta de dos cámaras: una (cardias) que se encarga de moler el alimento en partículas. Es estrecha, alargada, con setas cortas y tiene una válvula cardiopilórica; y la otra (píloro) tiene por función la filtración de las partículas de alimento antes de que ingresen al hepatopáncreas. Es pequeña, sin setas y comprende una válvula pilórica, así como una crista interampular (**Figura 9**) (Cruz-Suárez, 1999; Abrunhosa y Melo, 2008; Muhammad *et al.*, 2012). El hepatopáncreas está formado por los lóbulos ramificados del intestino medio y se encarga del proceso de digestión enzimática (síntesis y secreción de enzimas), la absorción de nutrientes y mantenimiento de reservas (Cruz-Suárez, 1999; Muhammad *et al.*, 2012). En mysis, se ha reportado una disminución de la expresión génica de la tripsina, quimotripsina y amilasa con respecto a la etapa protozoal (Wei *et al.*, 2014). En cuanto a la lipasa, su expresión génica se mantiene estable (Wei *et al.*, 2014). Es importante señalar que la lipasa participa en el proceso de hidrólisis de los triacilglicéridos (Winkler, D'Arcy y Hunziker, 1990). Para la etapa postlarval temprana, la tripsina,

quimotripsina y lipasa disminuyen su actividad génica; sin embargo, la amilasa tiene un ligero incremento (Wei *et al.*, 2014). Por último, las estructuras del sistema digestivo terminarán por desarrollarse tanto externamente como internamente en la etapa postlarval y juvenil (Muhammad *et al.*, 2012).



**Figura 9.** Estómago de PL.I de *L. vannamei* (Fuente: Abrunhosa y Melo, 2008).

### **La expresión génica de enzimas digestivas**

La expresión génica es el proceso por medio del cual la información codificada por los ácidos nucleicos es transformada en una proteína que es usada para el desarrollo, funcionamiento o reproducción de los organismos (Salazar, Sandoval y Arméndaris, 2013). La expresión de un gen es controlada por proteínas unidas al ADN (factores transcripcionales) que identifican una secuencia específica. Dichas proteínas son reguladas por la señalización celular y son necesarias para la activación y apagado de los genes (Salazar, Sandoval y Arméndaris, 2013). Desde hace aproximadamente cuatro décadas, la expresión génica es usada como una herramienta para observar y evaluar los cambios bioquímicos en un organismo durante un momento metabólico definido y en diferentes órganos o tejidos (Salazar, Sandoval y Arméndaris, 2013). Actualmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica empleada para determinar la expresión génica. Dicha reacción se encarga de replicar de forma exponencial, *in vitro*, una molécula de ADN genómico (ADNg) o complementario (ADNc) a través de ciclos repetitivos. El ADNc es obtenido a partir de una molécula de ARN amplificada por el proceso de retrotranscripción. La longitud del producto amplificado por

PCR depende de los primers u oligonucleótidos diseñados para detectar el gen de interés (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

En camarones peneidos, la expresión génica de enzimas digestivas y actividad enzimática fue estudiada con el objetivo de comprender sus procesos digestivos y así elaborar dietas que puedan satisfacer sus requerimientos nutricionales (Le Moullac *et al.*, 1996). No obstante, la mayoría de estas investigaciones fueron realizadas en juveniles y adultos; existen pocos estudios en estadios larvarios. Lovett y Felder (1990) mostraron que la actividad de las enzimas amilasa, tripsina, carboxipeptidasas A y B, así como de las proteasas en larvas de *L. setiferus* varían en función de los cambios ontogénicos. Rodríguez y colaboradores (1994) también observaron estos cambios en la actividad de la amilasa y tripsina en larvas de *P. japonicus* y señalaron que dicha variación era influenciada por la concentración de proteínas en la dieta. En M.III de *L. vannamei*, un elevado contenido de proteínas y carbohidratos en el alimento mostró afectar de igual manera la síntesis de las enzimas amilasa, tripsina y quimotripsina (Le Moullac, Van Wormhoudt y AQUACOP, 1994; Le Moullac *et al.*, 1996). Los resultados de estos cuatro estudios fueron corroborados por Wei y colaboradores (2014), quienes determinaron la expresión génica de diferentes tipos de carbohidrasas, peptidasas y lipasas en larvas (desde N.V hasta PL.) y señalaron que la misma estaba influenciada por el desarrollo ontogénico y la composición del alimento.

La expresión génica de la amilasa, lipasa, tripsina y quimotripsina han sido detectadas en larvas de *L. vannamei* entre la etapa embrionaria y naupliar (Wei *et al.*, 2014). Se observó un incremento de la expresión de dichas enzimas en la etapa protozoéal, a excepción de la lipasa; mientras que en las larvas mysis se encontró una disminución de esta enzima. Entre el estadio de mysis y postlarva, la expresión génica de las enzimas permaneció constante (Wei *et al.*, 2014). La tripsina y amilasa tienen isoformas, es decir, distintas versiones estructurales, las cuales se descubrieron por los trabajos de Van Wormhoudt y Sellos (1996). La quimotripsina es una isoforma de la tripsina. La transcripción (síntesis de RNA a partir de ADNc para su traducción como una cadena proteica) de las isoformas de la tripsina puede influir en la actividad de esta enzima en juveniles de *L. vannamei*, así como el contenido de proteínas en la dieta (Sainz y Cordova, 2009). Dichos autores también registraron una baja actividad de tripsina en organismos alimentados una vez por día, y un incremento de esta 2h antes de la

siguiente alimentación. En camarones adultos de *L. vannamei*, se han reportado diferentes lipasas: una de ellas se encuentra únicamente en la glándula digestiva y participa activamente en la digestión de los lípidos (lipasa digestiva), mientras que otra se encuentra en distintos tejidos y se encarga de movilizar a los lípidos almacenados como triacilglicéridos (lipasa intracelular) (Rivera-Pérez, 2010).

La interacción de los componentes nutricionales en un alimento y sus efectos en la expresión génica en un organismo puede ayudar a seleccionar una presa o un alimento. La expresión génica de enzimas digestivas es por consecuencia de gran utilidad para la alimentación de los estadios larvarios del camarón blanco del Pacífico.

## JUSTIFICACIÓN

Recientemente, la *Artemia* ha sido reemplazada con éxito por *Panagrolaimus* sp. durante los primeros días de cultivo larval y postlarval del camarón blanco del Pacífico. *Panagrolaimus* sp. podría convertirse en una alternativa para el cultivo del camarón blanco del Pacífico a nivel mundial ya que el mercado es significativo. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para determinar la densidad óptima de nematodos a suministrar y la frecuencia de alimentación que permite un mayor crecimiento y supervivencia de las larvas. La alimentación de las larvas se verá reflejada en su composición bioquímica y en la evaluación de la expresión génica de enzimas digestivas, e incrementará el conocimiento sobre la aceptabilidad de *Panagrolaimus* sp. y su aprovechamiento nutricional como alimento vivo. El presente trabajo es parte de una investigación que busca innovar para disminuir significativamente los costos de producción y asegurar una alta sustentabilidad del sector camaronícola.

## HIPÓTESIS

Larvas de *L. vannamei* alimentadas con *Panagrolaimus* sp. suministrado con una mayor frecuencia y densidad tendrán un crecimiento y supervivencia superior, lo cual se verá reflejado también en la expresión de genes de enzimas digestivas y la composición bioquímica de las larvas.

## OBJETIVO GENERAL

Comparar dos densidades con dos frecuencias de suministro del nematodo *Panagrolaimus* sp. en la alimentación larvaria de *L. vannamei*, a través de la evaluación de la expresión génica de enzimas digestivas, composición bioquímica, crecimiento y supervivencia de las larvas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de dos densidades con dos frecuencias del suministro de *Panagrolaimus* sp. sobre el crecimiento, supervivencia y composición bioquímica de larvas PL.I de *L. vannamei*.
- Determinar la expresión génica de enzimas digestivas en larvas PL.I de *L. vannamei*, después de haber sido alimentadas con *Panagrolaimus* sp. a dos densidades y dos frecuencias diferentes.

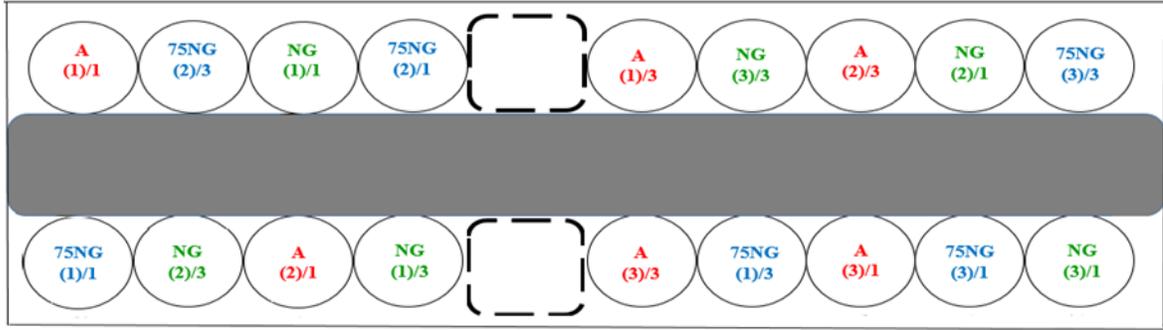
## MATERIAL Y MÉTODOS

### Bioensayo

El experimento fue realizado en las instalaciones del Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Para ello, se instaló un sistema de 18 unidades experimentales de 100L cada una, las cuales fueron llenadas a la mitad de su capacidad con agua marina filtrada (5µm) y esterilizada con luz ultravioleta. Cabe mencionar que cada unidad contenía dos difusores de aire (AS3, Seet water®) y un calentador de titanium de 200W (HMO-200, Finnex®).

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: temperatura de 31°C, oxígeno disuelto (OD) superior o igual a 5mg/L, salinidad entre 35 y 37 unidades prácticas de salinidad (ups), pH 8.5 y 12h luz/12h oscuridad. Para mantener un control sobre las variables fisicoquímicas del agua, se realizaron mediciones cada mañana a las 08:00h del OD y de la temperatura empleando un oxímetro (Pro20, YSI®). En el caso del pH, se usó un potenciómetro (pHTestr 10, Oakton®) y para medir la salinidad del agua se utilizó un refractómetro (Scientific BTX-1, Vee Gee®).

Nauplios V de *L. vannamei*, donados por la empresa Blue Genetics México, S.A. de C.V. (Pichilingue, B.C.S.), fueron distribuidos manualmente entre las 18 unidades experimentales a razón de 150 nauplios/L. Todos los nauplios fueron inicialmente alimentados con la microalga *Chaetoceros calcitrans* y el ensayo de alimentación inició cuando los animales estuvieron en el estadio de Zoea II. A partir de ese momento tres dietas fueron suministradas: 1- 100% *Artemia* (control); 2- 100% Nematodos; 3- 75% Nematodos y 25% *Artemia*. Se consideraron dos frecuencias de suministro (una y tres veces por día), empleando tres réplicas para cada una de ellas e impartíéndolas una vez por día (09:00 h) o tres veces por día (09:00, 14:00 y 17:00h). La distribución de las dietas y réplicas fue establecida de forma aleatoria (**Figura 10**).



**Figura 10.** Esquema de la distribución de las unidades experimentales del bioensayo.

A. Larvas alimentadas con 100% *Artemia*, NG. Larvas alimentadas con 100% nematodos, 75NG. Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. Los números dentro de los paréntesis representan las réplicas. Las cifras después de la diagonal representan las frecuencias de suministro de las dietas.

En el **Cuadro 2**, se muestran las concentraciones de microalgas, nematodos y artemias que se suministraron diariamente durante el bioensayo, de acuerdo al protocolo de alimentación establecido con la empresa Blue Genetics México y adaptado al volumen de las unidades experimentales.

**Cuadro 2.** Protocolo de alimentación larvaria

Día de cultivo	Estadio larvario	Microalga <i>C. calcitrans</i> Celx10 <sup>6</sup> /Unidad	Tratamientos			
			100% Artemia A	100% Nematodos NG	75% Nematodos + 25% Artemia 75NG	
			Presa/Unidad	Presa/Unidad	Presa/Unidad	
1	Nauplio V	3,000	.....	.....	.....	.....
2	Zoea I	4,240	.....	.....	.....	.....
3	Zoea II	4,480	.....	2,000,000	1,500,000	.....
4	Zoea II/Zoea III	6,000	.....	2,000,000	1,500,000	.....
5	Zoea III	7,200	20,000	2,000,000	1,500,000	+ 5000
6	Zoea III/Mysis I	7,200	26,667	2,666,667	2,000,000	+ 6,667
7	Mysis I	6,000	26,667	2,666,667	2,000,000	+ 6,667
8	Mysis II	4,800	30,000	3,000,000	2,250,000	+ 7,500
9	Mysis III	3,600	36,667	3,666,667	2,750,000	+ 9,167
10	Mysis III/Postlarva I	.....	46,667	4,666,667	3,500,000	+ 11,667

### Conteo de la microalga *Chaetoceros calcitrans*

Durante el bioensayo, aproximadamente 15L de *Chaetoceros calcitrans* fueron proporcionados diariamente por el Laboratorio de Producción de Microalgas del CIBNOR. La concentración de microalga fue determinada cada mañana para establecer la cantidad a proporcionar a cada unidad experimental. Para ello, se tomó 1mL de microalga, el cual se diluyó con 9mL de agua destilada. Posteriormente, se depositó 10µL de la muestra diluida

(1:10) en una cámara de Neubauer y se realizó el conteo con un microscopio óptico (MC8102, Lieder®). A partir de la muestra, se hicieron dos conteos, registrando únicamente las células presentes dentro de los cuatro cuadrantes. Los dos conteos fueron promediados y la concentración de la microalga (células/mL) fue calculada usando la siguiente ecuación (Bastidas, 2011):

$$\text{Concentración de microalga (células/mL)} = \frac{\text{Número de células} \times \text{factor de dilución} \times 10,000}{4 \text{ cuadrantes contados}}$$

Empleando el mismo método, se determinó la concentración de microalga residual presente en las unidades experimentales. La proporción de microalga añadida diariamente en los estanques dependió de la cantidad presente en las unidades y de la concentración definida por el protocolo de alimentación (**Cuadro 2**).

### **Conteo de nematodos**

Nematodos *Panagrolaimus* sp. fueron producidos y enriquecidos en DHA con el dinoflagelado *C. cohnii* por la empresa E-NEMA (Schwentinental, Alemania). Antes de ser enviados a México, los nematodos fueron deshidratados sobre filtros circulares de papel celulosa de 15cm de diámetro.

Durante el bioensayo, se cortó diariamente una porción de papel filtro, la cual fue colocada 2h en 50mL de agua potable para hidratar a los nematodos. Una vez hidratados, se realizó un conteo bajo microscopio óptico (MC8102, Lieder®), a partir de 1mL de muestra, la cual fue colocada en forma de gotas sobre un portaobjetos. La concentración total de nematodos por mililitro fue calculada contando todos los individuos presentes en la muestra.

### **Eclosión, cosecha y conteo de *Artemia***

La eclosión de quistes de *Artemia franciscana* (Artemia 80% de eclosión, Biogrow®) fue realizada en una cubeta con 10L de agua a 15ups, aproximadamente 24h antes de suministrar la *Artemia* a las larvas. Durante el proceso de eclosión, la cubeta fue mantenida a 24°C, bajo aireación fuerte y expuesta a la luz.

Después de 24h, los nauplios de *Artemia* fueron cosechados en un tamiz de 250 $\mu$ m y desinfectados con yodo (1:1000) durante 5 a 10min. Enseguida, se realizó dos conteos a partir de una muestra de 1mL, la cual fue dividida en gotas sobre una caja Petri. El conteo se hizo bajo un microscopio estereoscópico (M18SL, VelaQuin®) y se determinó la concentración de *Artemia* por mililitro.

### **Revisión de larvas y medición**

La densidad de larvas en cada unidad experimental se revisó diariamente, usando una lámpara de mano. Adicionalmente, se colectaron tres larvas en una réplica de cada tratamiento y se determinó el estadio de desarrollo y aspecto morfológico general (presencia de gotas lipídicas, tracto digestivo lleno, presencia de malformaciones). Dichas evaluaciones fueron realizadas por medio de un microscopio óptico (BX51-P, Olympus®).

### **Muestreo**

Una vez que el 80% de los animales estuvieron en PL.I, se realizó el muestreo que consistió en vaciar cada unidad y concentrar las larvas en un vaso de precipitado de 500mL. Diez larvas de cada unidad fueron capturadas al azar y fotografiadas *in vivo* por medio de un microscopio óptico (BX51-P, Olympus®) y una cámara fotográfica (MicroPublisher 5.0 RTV, QImaging®). A partir de estas fotografías, se midió la longitud total (desde el rostrum hasta el telson) con el programa ImagePro (V.10, Media Cybernetics®) y se determinó el estadio larvario. Adicionalmente, para determinar el peso seco de las larvas, se colectaron 30 organismos, los cuales fueron lavados con agua desionizada y colocados en charolas de aluminio, para pesarlas en una balanza analítica (AB54, Mettler Toledo®). Las charolas fueron puestas en un horno (Symphony, VWR®) a 85°C durante 30h. Transcurrido este tiempo, las charolas fueron acomodadas en un desecador durante 30min hasta su enfriamiento y enseguida pesadas en la balanza analítica. El peso seco de las larvas se determinó restando el peso de la charola.

Otro lote de larvas (130mg) fue lavada con agua desionizada y guardada en un tubo Eppendorf® con 1mL de esta misma agua, en un ultracongelador a -80°C para analizar posteriormente la composición bioquímica de las larvas. Por último, se colocaron alrededor de 85mg de larvas, rápidamente lavadas con agua de mar, en otro tubo Eppendorf®

conteniendo 0.3g de lysing matrix D (MP Biomedicals®), y una perla de cerámica (MP Biomedicals®). Dichas muestras fueron guardadas en un ultracongelador a -80°C para determinar posteriormente la expresión génica de enzimas digestivas en las larvas.

### **Análisis de muestras**

#### **Análisis bioquímicos**

Antes de ser procesadas, las muestras fueron deshidratadas por aproximadamente 36h por medio de una liofilizadora (Benchtop 3.5, VirTis®), pulverizadas (Fast Prep-24, MP™) e hidratadas con agua desionizada a razón de 1mL por 0.1g de muestra. Todos los análisis bioquímicos fueron realizados a partir del homogeneizado de cada unidad.

#### **Determinación en proteínas totales**

La concentración en proteínas totales fue determinada usando el método de Brown y colaboradores (1989). Para este análisis, 25µL del extracto fueron depositados en un minitubo donde se añadieron 500µL de NaOH (0.1N). Se dejó reposar la muestra durante 2h. La muestra se agitó con un vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries®) y se tomaron 25µL del producto, los cuales fueron sembrados en una microplaca. Se añadieron 200µL de ácido bicinonínico (BCA) con sulfato de cobre (50mL de BCA [B9643, Sigma-Aldrich®] con 1mL de sulfato de cobre [C2284, Sigma-Aldrich®]) y la microplaca fue incubada a 60°C en un horno (Symphony, VWR®) durante 15min. La absorbancia a 562nm fue leída con un espectrofotómetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific®). Para este análisis, se elaboró también una curva de calibración a partir de la dilución de albúmina bovina (P0914, Sigma-Aldrich®). Las concentraciones de la curva fueron las siguientes: 0.0156, 0.0312, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0mg/mL. Para el blanco se utilizó agua desionizada.

#### **Determinación en lípidos totales**

Se cuantificó la concentración en lípidos totales de acuerdo al método de Barnes y Blackstock (1973). Para ello, 25µL del homogeneizado fueron pipeteados y depositados en un minitubo. Enseguida, se añadieron 250µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (9681-02, Jt Baker ACS®) y se calentó el tubo a 90°C en baño maría durante 10min. El tubo fue posteriormente enfriado en

un baño con hielo y 25µL de la muestra fueron sembrados en una microplaca, donde 200µL de reactivo de fosfovainillina (VX0045-1, EM Science®) fueron agregados. La microplaca fue incubada durante 40min a temperatura ambiente y la lectura en el espectrofotómetro (Multiskan Spectrum, Thermo®) se realizó a 540nm. Para la obtención de la curva de calibración, se preparó una solución de lípidos (Lin-Trol L2648, Sigma-Aldrich®), la cual fue diluida sucesivamente. Las concentraciones de la curva fueron: 0.234, 0.468, 0.937, 1.875, 3.75, 7.5 y 15.0mg/mL. El blanco se hizo con etanol al 96%.

### **Determinación en glucógeno**

La técnica desarrollada por Van Handel (1965) fue usada para medir la concentración en glucógeno de las larvas. Primeramente, 100µL del homogeneizado fueron mezclados con 100µL de ácido tricloracético (TCA; 76-03-9, BDH) al 10% y la muestra se centrifugó a 3000rpm (Centrifuge 5810 R, Eppendorf®), 10min a 5°C. Enseguida, 25µL del sobrenadante fue mezclado con 500µL de etanol frío al 96%. La muestra se centrifugó nuevamente a 3000rpm, 10min a 5°C y se retiró el alcohol por medio de una micropipeta y posteriormente se colocó la muestra en un horno a 70°C (Symphony, VWR®) durante 30min. Una vez seca la muestra, se le añadieron 25µL de agua destilada y 250µL de antrona (0.001 g de antrona en 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 76%; A-1631, Sigma-Aldrich®) y se calentó a 85°C durante 10min. Por último, se enfrió la muestra en un baño de hielo y se sembraron 200µL en una microplaca para leer la absorbancia a 620nm con el espectrofotómetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific®). Para la obtención de la curva de calibración, se preparó una solución de glucógeno (G-8751, Sigma-Aldrich®) de 5mg/mL, la cual fue diluida varias veces. Las concentraciones seleccionadas para la curva fueron: 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25 y 2.5mg/mL. Para el blanco, se usó TCA al 10%.

### **Determinación en carbohidratos totales**

Para esta cuantificación, se siguió la técnica de Roe (1955). Se mezclaron 100µL del homogeneizado con 100µL de ácido tricloracético (TCA; 76-03-9, BDH) al 10% y la muestra se centrifugó a 3600rpm, 10min a 5°C. Se recuperaron 25µL del sobrenadante, a los cuales se les añadieron 250µL de antrona (0.001 g de antrona en 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 76%; A-1631, TCA; 76-03-9, BDH) y se calentó a 85°C durante 10min. Se enfrió la muestra en un baño de

hielo y se sembraron 200 $\mu$ L en una microplaca para determinar la absorbancia a 620nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific®). Para la curva de calibración, se preparó una solución de glucosa (G-8270, Sigma-Aldrich®), la cual fue diluida sucesivamente para obtener las siguientes concentraciones: 0.039, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25 y 2.5mg/mL. Se empleó TCA al 10% para el blanco.

### **Análisis de expresión génica de enzimas digestivas**

#### **Extracción del ácido ribonucleico (ARN)**

Para la extracción de ARN, se utilizó el kit FastRNA Pro Green (MP Biomedicals®) siguiendo el protocolo del fabricante (**Anexo 1**). Se agregó primeramente 1mL de solución RNAPro™ a las muestras y se homogeneizaron con el FASTprep24 (Fisher Scientific®) (Velocidad 6.0 durante 40s). Una vez obtenido el ARN, se prosiguió a medir su pureza y concentración en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®). Para ello, se usó el cociente de la absorbancia registrada a 260nm sobre la obtenida a 280nm y se consideró como ARN de buena calidad las muestras que tenían un coeficiente entre 1.8 y 2.1. Las muestras se ajustaron a una concentración de 400 $\mu$ g/ $\mu$ L de ARN.

#### **Síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)**

A partir de las soluciones de ARN ajustadas a 400 $\mu$ g/ $\mu$ L, se realizó la síntesis de ADN complementario de acuerdo a las especificaciones y recomendaciones del fabricante del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®), las cuales se muestran en el **Anexo 2**. Para la síntesis, se utilizaron 5 $\mu$ L de ARN a una concentración de 400 $\mu$ g/ $\mu$ L, 1 $\mu$ L de oligo dT (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L) y 1 $\mu$ L (40 $\mu$ g/ $\mu$ L) de transcriptasa reversa. El patrón de temperaturas que se usó fue el siguiente: 25°C durante 10min, 45°C durante 60min y 70°C durante 15min.

#### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis**

Se procedió a efectuar un PCR de punto final con el kit de Go Taq Flexi DNA Polymerase, Promega® para la amplificación de la síntesis del ADNc, utilizando el gen constitutivo proteína ribosomal L8 (LvRPL8) (Sentido 5'-CCACACCCGTAAGGGAAAG-3'; antisentido 5'-GGTTACCACCACCATGAGG-3'). La reacción de PCR se realizó a un

volumen de 12.5µL con los siguientes componentes: Buffer 5X Green Go Taq, MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTPs 2.5mM y Go Taq DNA polimerasa 5U/µL (Promega®). El programa constó de 38 ciclos y el perfil de temperaturas empleado en el termociclador (MyCycler™ 170-9701, Bio Rad®) fue el siguiente: 95°C durante 2min, 95°C durante 30s, 59°C durante 30s, 72°C durante 1min y una extensión a 72°C durante 5min. El producto del PCR se visualizó por medio de una electroforesis desnaturalizante en un gel de agarosa al 1.0 % con buffer TAE 1x y GelRED®.

### **Selección de genes de enzimas digestivas y diseño de oligonucleótidos para PCR en tiempo real**

Se diseñaron tanto los oligonucleótidos de las enzimas digestivas (amilasa, catepsina, lipasa, tripsina y quimotripsina) como los de los genes de referencia ( $\beta$ -Tubulina y factor de elongación 1- $\alpha$  (LvEF1- $\alpha$ )) para ser utilizados como cebadores de referencia. Se emplearon los programas accesibles en línea Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) y Perl3PrimerPlus ([http://primer3plus.com/cgi-bin /dev](http://primer3plus.com/cgi-bin/dev)) para el diseño de los oligonucleótidos (**Anexo 3**). Las propiedades de los oligonucleótidos (1-Temperatura de hibridación: entre 61°C y 62°C; 2-Cantidad de Guanina, Citosina y tamaño del producto: entre 19 y 21 pares de bases; 3-Verificación de ausencia de formación de estructuras secundarias) fueron analizadas con los programas OligoEvaluator™, (<http://www.oligoevaluator.com/OligoEvaluator>) y OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Los amplicones obtenidos por PCR de cada par de cebadores se observaron en un gel al 1.0% de agarosa con buffer TAE 1X. Esto permitió la verificación del tamaño de los productos, su especificidad y descartar una contaminación (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3. Secuencias génicas de los oligonucleótidos**

Gen	Secuencia 5' - 3'		Amplicon (PB)
	Sentido	Antisentido	
<b>β-Tubulina</b>	ATGGATCCCAACACGTAA	CGCCTGAACATAGCAGTGAA	135
<b>LvEF1-α</b>	TGGCTACTCACCTGTGCTTG	CCAGCTCCTTACCAGTACGC	98
<b>Amilasa</b>	CAATCAGGTGACGGTGAAC	CTTGTGGACGAAGACGAC	196
<b>Catepsina</b>	AGCCGTCCTTCCAGTTCTAC	GAGTTCTTGACCAGCCAGT	136
<b>Quimotripsina</b>	GTTCCCTCATCTCCAGCG	GTTCCAGTTCTCGTGAGTGAA	158
<b>Tripsina</b>	TCTGAGCTTCAATGACAACG	GAACGGTCACCTTCTGCA	140
<b>Lipasa</b>	CTTCATACATGGGAACGCAG	TGAGTCTGAGGTGGATGATG	121

### Curvas de calibración y PCR de tiempo real (qPCR)

Se tomaron 5µL del ADNc de cada muestra para hacer un concentrado y realizar las curvas de calibración para evaluar la eficiencia de los oligonucleótidos. Para ello, se llevaron a cabo diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000) tanto del concentrado como de los oligonucleótidos (10mM, 5mM y 2.5mM). Se verificó la eficiencia de la reacción de los oligonucleótidos y del concentrado con el porcentaje de eficiencia de amplificación [ $e = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$ ], utilizando la calculadora en línea de Thermo Fisher® (qPCR efficiency calculator). La eficiencia indica la capacidad de duplicación del número de copias de las cadenas de ADN o ADNc por ciclo (Pfaffl, 2004). Cada reacción se hizo con la iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio RaD®) en un volumen total de 10µL (1µL de ADNc + 1µL de primer forward + 1µL de primer reverse + 2µL de agua Milli Q + 5µL de iTaq™ Universal SYBR Green Supermix). Las reacciones de qPCR se efectuaron por triplicado empleando al robot epMotion 5075 de Eppendorf® en placas para qPCR de Neptune®. Se ejecutó el sistema de detección del termociclador CFX 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio Rad®). La desnaturalización del ADNc se hizo a 95°C durante 30s y la hibridación a 95°C durante 15s. Se empleó 60°C como temperatura de fusión (TM) durante 30s (40 ciclos) y la extensión del ADNc se llevó a cabo a 72°C por 20s. Cabe aclarar que para el análisis de las muestras se usó ADNc sin diluir y que la concentración utilizada para los oligonucleótidos fue de 10mM.

Al final de cada qPCR, se obtuvo una curva de amplificación que confirma la especificidad de la reacción (oligonucleótido-muestra). A partir de esta curva, se determinó el punto en el

que la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia umbral (basal o threshold), el cual se define como el ciclo umbral (“crossing point” o “threshold point” o “cp”).

### **Análisis estadísticos**

Los resultados del desempeño zootécnico (longitud total, peso seco, supervivencia y porcentaje de organismos en PL.I) así como de la composición bioquímica de las larvas se analizaron estadísticamente con el programa JMP Statistical Software® versión 10.

Se usó un modelo estadístico con un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3×2 para las variables del desempeño zootécnico y 2×2 para las de composición bioquímica:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$\mu$ . Media general;

$\alpha$ . Efecto debido al nivel del factor dieta (i: A, NG, 75NG);

$\beta$ . Efecto debido al nivel del factor frecuencia (j: 1, 3);

$(\alpha\beta)_{ij}$ . Efecto de la interacción en la combinación de los factores;

$\epsilon_{ijk}$ . Error aleatorio.

El cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad de las varianzas de los datos se evaluó por medio de las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett respectivamente. Para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, los datos de longitud total fueron transformados a la raíz cuadrada de la variable, y los de supervivencia y porcentaje de organismos en el estadio PL.I, se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada de la variable. En los resultados de la composición bioquímica, la dieta de 100% nematodos fue descartada debido a que sólo se pudo analizar una muestra (n=1) a pesar de las tres réplicas que se tenían. La comparación múltiple de medias se realizó a través de la Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

En cuanto a los resultados de expresión génica, se capturaron los valores de los ciclos umbrales obtenidos de los qPCR en el programa REST2009© (“Relative expression software tool”; Pfaffl, Horgan y Dempfe, 2002) para el análisis estadístico. Dicho programa se encarga de cuantificar y comparar la expresión génica. La cuantificación relativa se basó en la

relación entre los niveles de los genes de interés (enzimas digestivas) y los de referencia (constitutivos). El método matemático empleado por el programa es el siguiente:

$$expR = \frac{(EGIn)\Delta CPI_{n}(Control - Experimental)}{(EGRef)\Delta CPRef(Control - Experimental)}$$

**expR.** Expresión relativa; **EGIn.** Eficiencia del gen de interés; **ΔCPI<sub>n</sub>.** Diferencia del cp del gen de interés del grupo control menos el cp del gen de interés del grupo experimental; **EGRef.** Eficiencia del gen de referencia; **ΔCPRef.** Diferencia del cp del gen de referencia del grupo control menos el cp del gen de referencia del grupo experimental.

Se empleó como grupo control al tratamiento de alimentación 100% *Artemia* y los genes de referencia fueron el Factor de Elongación 1-α y β-tubulina. A los datos obtenidos, se les realizó un análisis subsecuente de significancia estadística PFRR (PairWise Fixed Reallocation Randomisation Test©). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a P<0.05. La representación visual de los resultados se realizó por medio de gráficos de caja-bigotes.

## RESULTADOS

### Calidad del agua

El **Cuadro 4** muestra el promedio y la desviación estándar de las variables fisicoquímicas medidas en los tratamientos experimentales. Todas las variables registradas se mantuvieron dentro de las condiciones óptimas para el cultivo larvario de *L. vannamei*. Adicionalmente, no se registraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos, lo que evidencia que las larvas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones ambientales.

**Cuadro 4. Parámetros fisicoquímicos en el agua de cultivo durante el bioensayo**

Parámetros fisicoquímicos	Tratamientos					
	1 vez / día			3 veces / día		
	A	NG	75NG	A	NG	75NG
Temp (°C)	31.8±0.48	31.7±0.49	31.8±0.37	31.6±0.30	31.7±0.44	31.6±0.25
OD (mg/L)	4.94±0.49	4.91±0.43	4.96±0.52	4.93±0.46	4.97±0.48	4.98±0.54
Sal (ups)	36.9±0.9	36.9±0.9	36.5±0.9	36.9±0.9	36.6±0.8	36.7±0.9
pH	8.5±0.03	8.5±0.04	8.5±0.01	8.5±0.03	8.5±0.01	8.5±0.01

Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  desviación estándar. Notas: **A.** Larvas alimentadas con 100% *Artemia*, **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. **Temp.** Temperatura, **OD.** Oxígeno disuelto, **Sal.** Salinidad. La ausencia de literales implica que no se encontraron diferencias significativas.

### Desempeño zootécnico de las larvas

El **Cuadro 5** muestra el promedio y el error estándar de las variables: longitud total, peso seco, supervivencia y número de organismos en PL.I de los diferentes tratamientos experimentales.

La mayoría de los organismos alcanzaron el estadio PL.I después de 9 días de cultivo. La supervivencia durante el bioensayo varió entre 13% y 14%, sin que se encontraran diferencias significativas ( $P>0.05$ ). De igual manera, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de organismos en estadio PL.I entre los diferentes tratamientos ( $P>0.05$ )

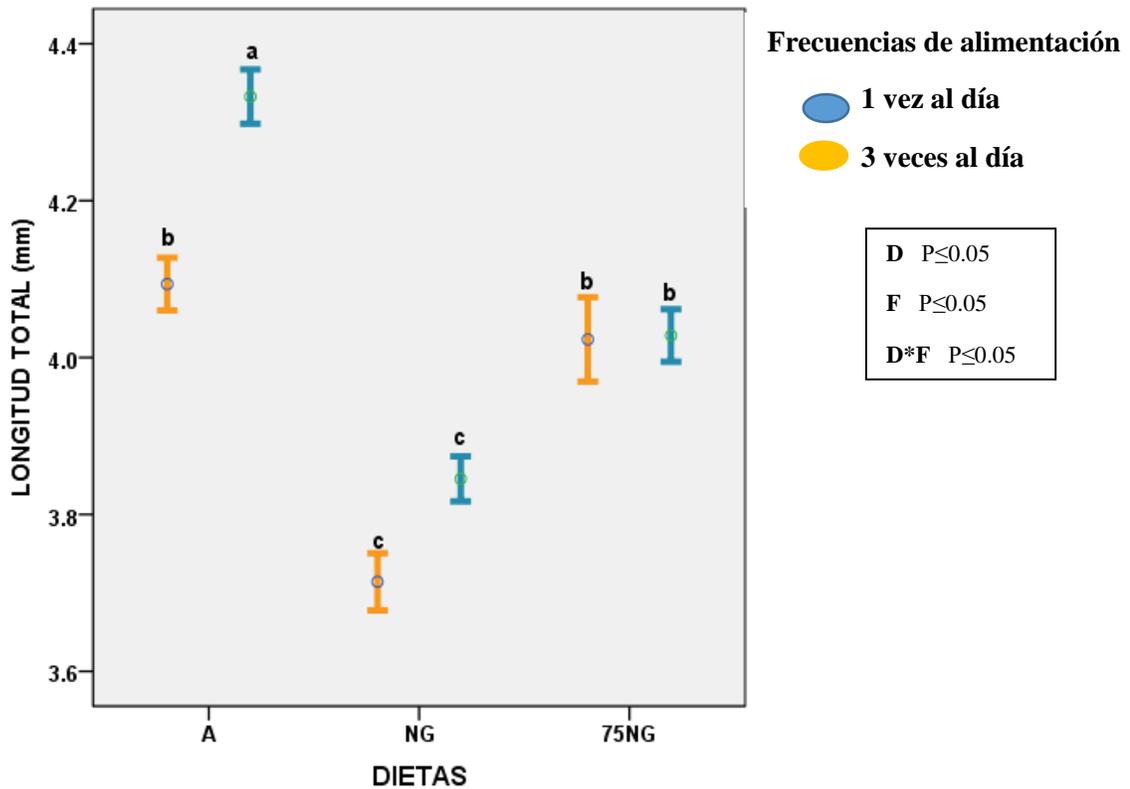
Se observó un efecto significativo de la interacción de los factores dieta y frecuencia de suministro para la longitud total y el peso seco de las larvas.

**Cuadro 5. Desempeño zootécnico de las larvas de *Litopenaeus vannamei* durante el bioensayo.**

Variables zootécnicas	Tratamientos						p-valor D*F
	1 vez / día			3 veces / día			
	A	NG	75NG	A	NG	75NG	
Longitud total (mm)	4.09±0.03 <sup>b</sup>	3.71±0.04 <sup>c</sup>	4.02±0.05 <sup>b</sup>	4.33±0.03 <sup>a</sup>	3.85±0.03 <sup>c</sup>	4.03±0.03 <sup>b</sup>	0.0101
Peso seco (µg)	49.8±2.09 <sup>ab</sup>	48.4±1.65 <sup>ab</sup>	52.9±5.31 <sup>ab</sup>	62.6±3.04 <sup>a</sup>	39.2±0.83 <sup>b</sup>	48.6±6.54 <sup>ab</sup>	0.0414
Supervivencia (%)	14.3±1.75 <sup>a</sup>	14.3±4.80 <sup>a</sup>	13.2±2.86 <sup>a</sup>	14.3±5.83 <sup>a</sup>	8.5±3.30 <sup>a</sup>	16±0.83 <sup>a</sup>	
Organismos en PL.I (%)	96.6±2.09 <sup>a</sup>	70±1.65 <sup>a</sup>	90±5.31 <sup>a</sup>	100±3.04 <sup>a</sup>	90±0.83 <sup>a</sup>	93.3±6.54 <sup>a</sup>	

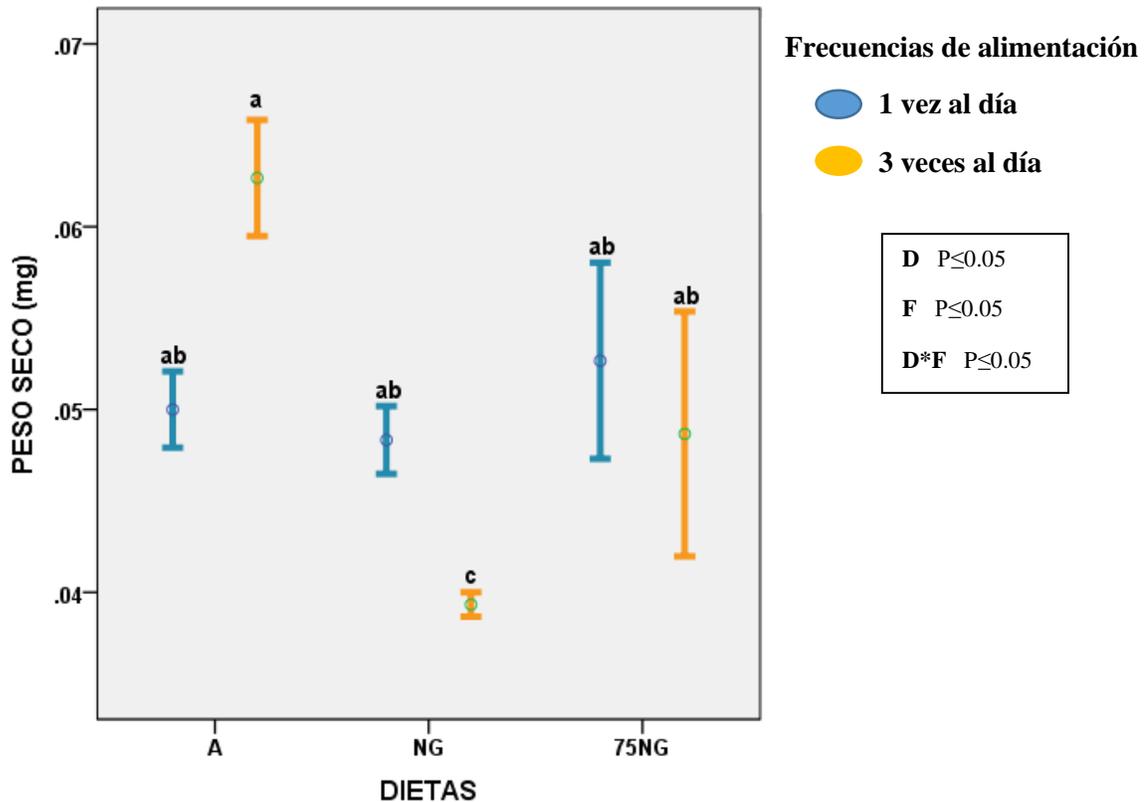
Los resultados se muestran como promedio ± error estándar. Notas: **A.** Larvas alimentadas con 100% *Artemia*, **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. **D\*F.** Interacción de los factores Dieta y Frecuencia; el efecto fue considerado significativo cuando  $P\leq 0.05$ . Las letras superescritas indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. Tamaño de muestras: Longitud total y Organismos en PL.I (n=30 larvas para todos los tratamientos, a excepción de [NG 1 vez/día] n=20), Peso seco (n=3 "pool" de 10-47 larvas para todos los tratamientos), Supervivencia (n=3 conteos de 4-11 larvas para todos los tratamientos, a excepción de [NG 3 veces/día] y [75NG 3 veces/día] n=2).

La longitud de las larvas alimentadas con 100% *Artemia* tres veces al día resultó ser significativamente mayor con respecto a la de los organismos del resto de los tratamientos. Adicionalmente, se observó que las larvas cultivadas con 100% *Artemia* una vez al día y 75% nematodos + 25% *Artemia* una y tres veces al día tuvieron una longitud total similar. Las larvas de menor longitud fueron aquellas alimentadas con 100% nematodos una y tres veces al día (Cuadro 5 y Figura 11).



**Figura 11.** Interacción de la dieta y frecuencia de suministro en la longitud total (mm) de larvas de *L. vannamei*. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. Notas: **A.** Larvas alimentadas con 100% *Artemia*, **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. **D.** Dieta, **F.** Frecuencia de alimentación, **D\*F.** Interacción de los factores Dieta y Frecuencia; el efecto fue considerado significativo cuando  $P \leq 0.05$ . Las letras (a, b y c) indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos.

Respecto al peso seco, las PL.I mantenidas con 100% *Artemia* tres veces al día mostraron ser significativamente más pesadas que las alimentadas con 100% nematodos tres veces al día. Los organismos presentes en el resto de los tratamientos mostraron un peso seco similar entre ellos pero mayor al tratamiento 100% nematodos tres veces al día (**Figura 12**).



**Figura 12.** Interacción de la dieta y frecuencia de suministro en el peso seco (mg) de larvas de *L. vannamei*. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. Notas: **A**. Larvas alimentadas con 100% *Artemia*, **NG**. Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG**. Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. **D**. Dieta, **F**. Frecuencia de alimentación, **D\*F**. Interacción de los factores Dieta y Frecuencia; el efecto fue considerado significativo cuando  $P \leq 0.05$ . Las letras (a y b) indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos.

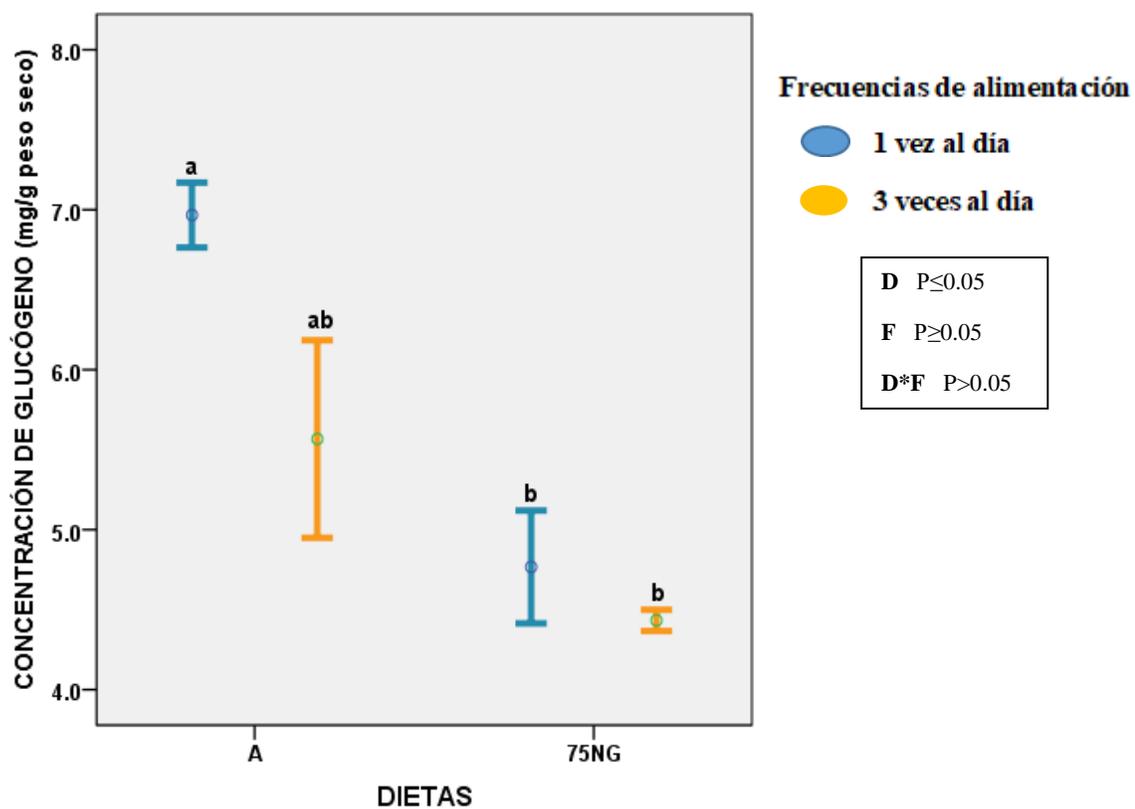
### Composición bioquímica de las larvas

Como se muestra en el **Cuadro 6** no se encontró una interacción de los factores dieta y frecuencia en ninguna de las variables bioquímicas determinadas. En el caso del nivel de glucógeno, se observó un efecto de la dieta; las larvas alimentadas con la dieta 100% *Artemia* mostraron una mayor concentración de este metabolito ( $6.26 \pm 0.42$ mg/g de peso seco) que aquellas alimentadas con 75% de nematodos + 25% de *Artemia* ( $4.60 \pm 0.17$ mg/g de peso seco). No se observaron diferencias significativas en el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos totales entre los diferentes tratamientos.

**Cuadro 6. Composición bioquímica de las larvas de *Litopenaeus vannamei* durante el bioensayo**

Variables bioquímicas	Tratamientos				p-valor D*F
	1 vez / día		3 veces / día		
	A	75NG	A	75NG	
Proteínas totales (mg/g peso seco)	335.79±4.04	335.85±13.81	343.64±8.47	308.74±11.59	Sin interacción
Lípidos totales (mg/g peso seco)	72.79±1.76	85.33±2.29	81.67±5.89	82.26±2.50	
Carbohidratos totales (mg/g peso seco)	8.85±0.57	10.20±0.58	8.44±0.54	9.24±0.57	
Glucógeno (mg/g peso seco)*	6.95±0.22 <sup>a</sup>	4.78±0.33 <sup>ab</sup>	5.59±0.60 <sup>b</sup>	4.43±0.09 <sup>b</sup>	

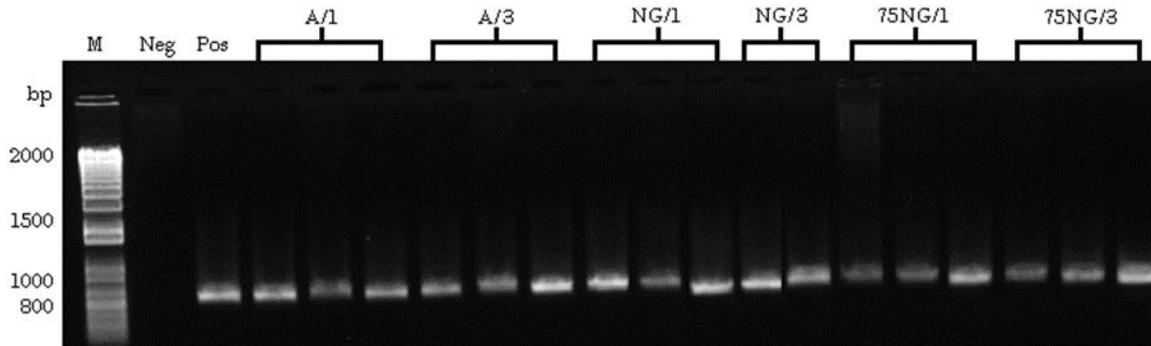
Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. Notas: **A.** Larvas alimentadas con 100% *Artemia*, **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. **D\*F.** Interacción de los factores Dieta y Frecuencia, el efecto significativo (**P $\leq$ 0.05**). El \* indica un efecto dieta. Tamaño de muestras: Proteínas, Lípidos, Carbohidratos totales y Glucógeno (n=3 “pool” de más de 50 larvas cada uno para todos los tratamientos. Fue excluido del análisis estadístico la dieta 100% Nematodos con sus dos frecuencias de alimentación.



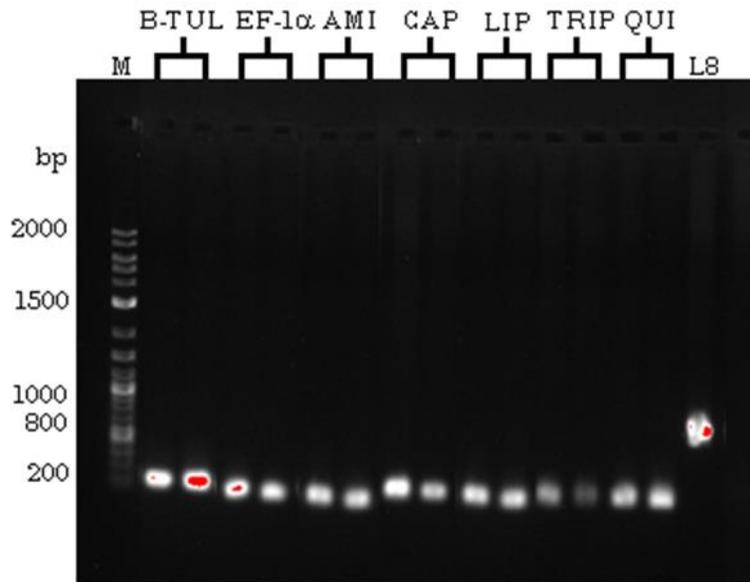
**Figura 13.** Efecto de la dieta en la concentración de glucógeno (mg/g de peso seco) en larvas de *L. vannamei*. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. Notas: **A.** Larvas alimentadas con 100% Artemia, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% Artemia. **D.** Dieta, **F.** Frecuencia de alimentación, el efecto fue considerado significativo cuando  $P \leq 0.05$ . Las letras (a y b) indican donde radican las diferencias significativas entre los tratamientos. Fue excluido del análisis estadístico la dieta 100% Nematodos con sus dos frecuencias de alimentación.

### Corroboración por medio de geles de agarosa de la síntesis de ADNc y diseño de oligonucleótidos

En la **Figura 14**, se muestra el gel de agarosa que corrobora la obtención de ADNc a partir de las muestras de PL.I. De igual manera, la efectividad de los oligonucleótidos tanto de las enzimas digestivas como de los genes constitutivos se presenta en la **Figura 15**.



**Figura 14.** Gel de agarosa al 1.0% teñido con GelRED empleando el gen constitutivo LvRPL8 856bp para corroborar la obtención de ADNc. **M.** Marcador de peso molecular; **Neg.** Control negativo (agua MilliQ); **Pos.** Control positivo ADNc de camarón adulto; **A.** Larvas alimentadas con 100% *Artemia*; **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*; **/1.** Una vez al día; **/3.** Tres veces al día. Tamaño de muestras por tratamiento (n=3 “pool” de aproximadamente 85mg de larvas, a excepción de [NG 3 veces al día] n=2).

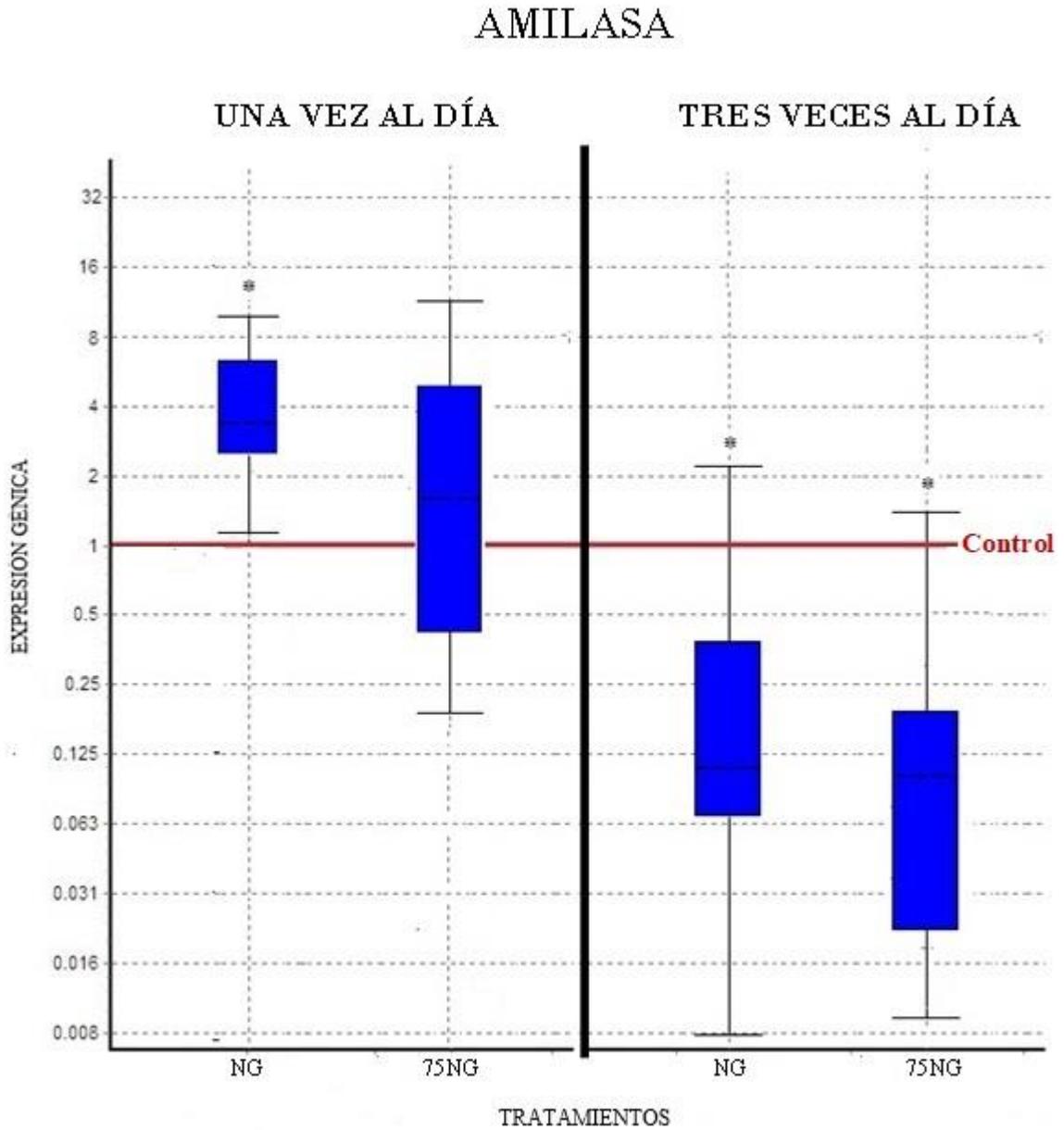


**Figura 15.** Gel de agarosa al 1.0% teñido con GelRED empleando los genes constitutivos B-Tubulina y factor de elongación 1- $\alpha$ , al igual que los genes de las enzimas digestivas. **M.** Marcador de peso molecular;  **$\beta$ -TUL.**  $\beta$ -Tubulina; **EF-1 $\alpha$ .** Factor de elongación 1- $\alpha$ ; **AMI.** Amilasa; **CAP.** Catepsina; **LIP.** Lipasa; **TRIP.** Tripsina; **QUI.** Quimotripsina; **L8.** Control positivo ADNc de camarón adulto. Tamaño de la muestra por gen (n=2).

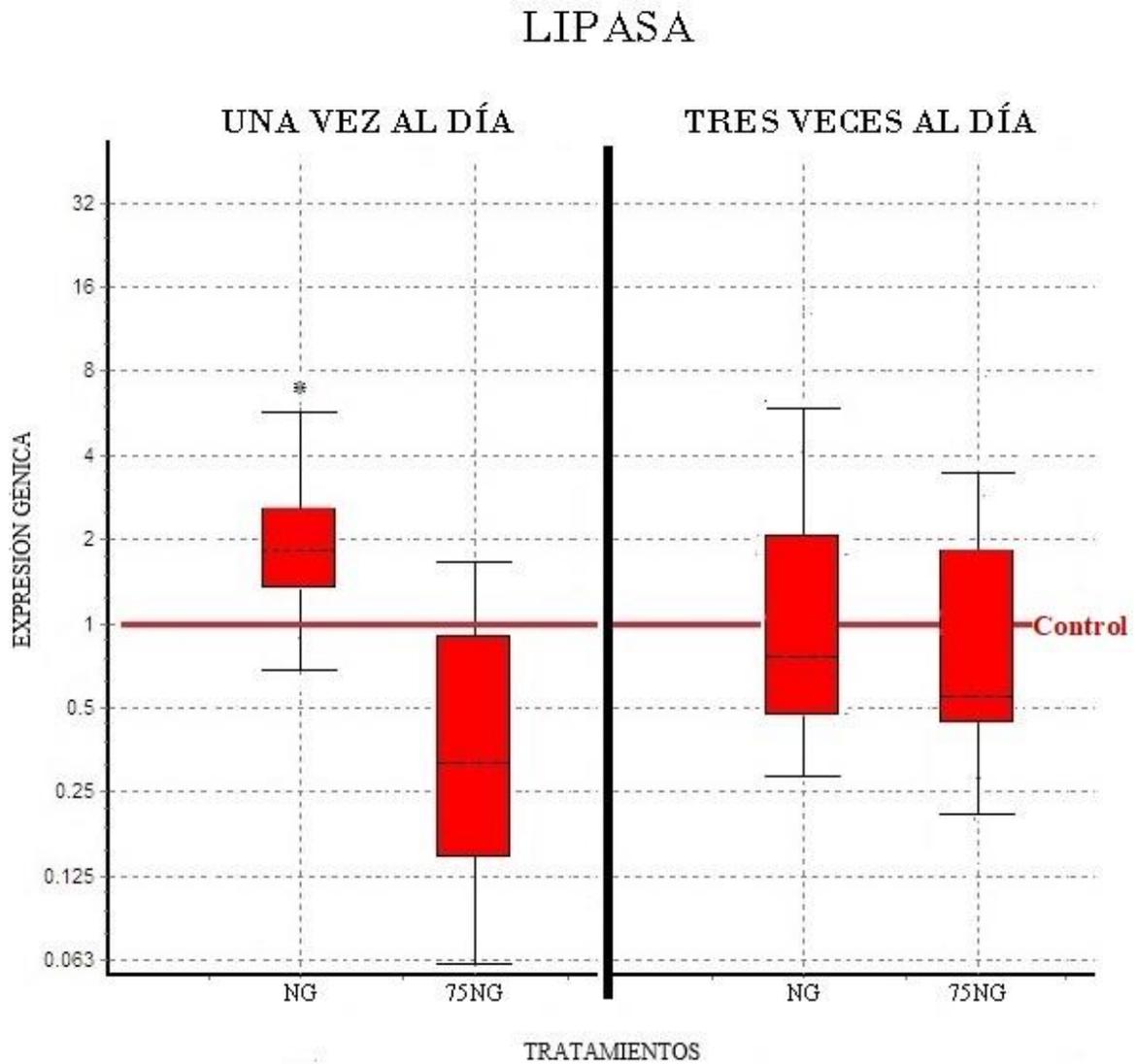
### **Análisis de la expresión génica de las enzimas digestivas**

Las **Figuras 16, 17, 18, 19, 20** y el **Cuadro 7** muestran la expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas estudiadas en larvas PL.I de *L. vannamei*. La expresión génica de las enzimas amilasa, lipasa y quimotripsina fue significativamente más alta ( $P=0.001$ ;  $P=0.012$ ;  $P=0.001$ , respectivamente) en las larvas alimentadas con 100% de nematodos ofrecidos una vez al día con respecto a las larvas del tratamiento control; no obstante, se observó una disminución de la expresión génica de la amilasa, tripsina y catepsina en las PL.I ( $P=0.011$ ;  $P=0.003$ ;  $P=0.026$ , respectivamente) cuando se suministró esta misma dieta tres veces por día.

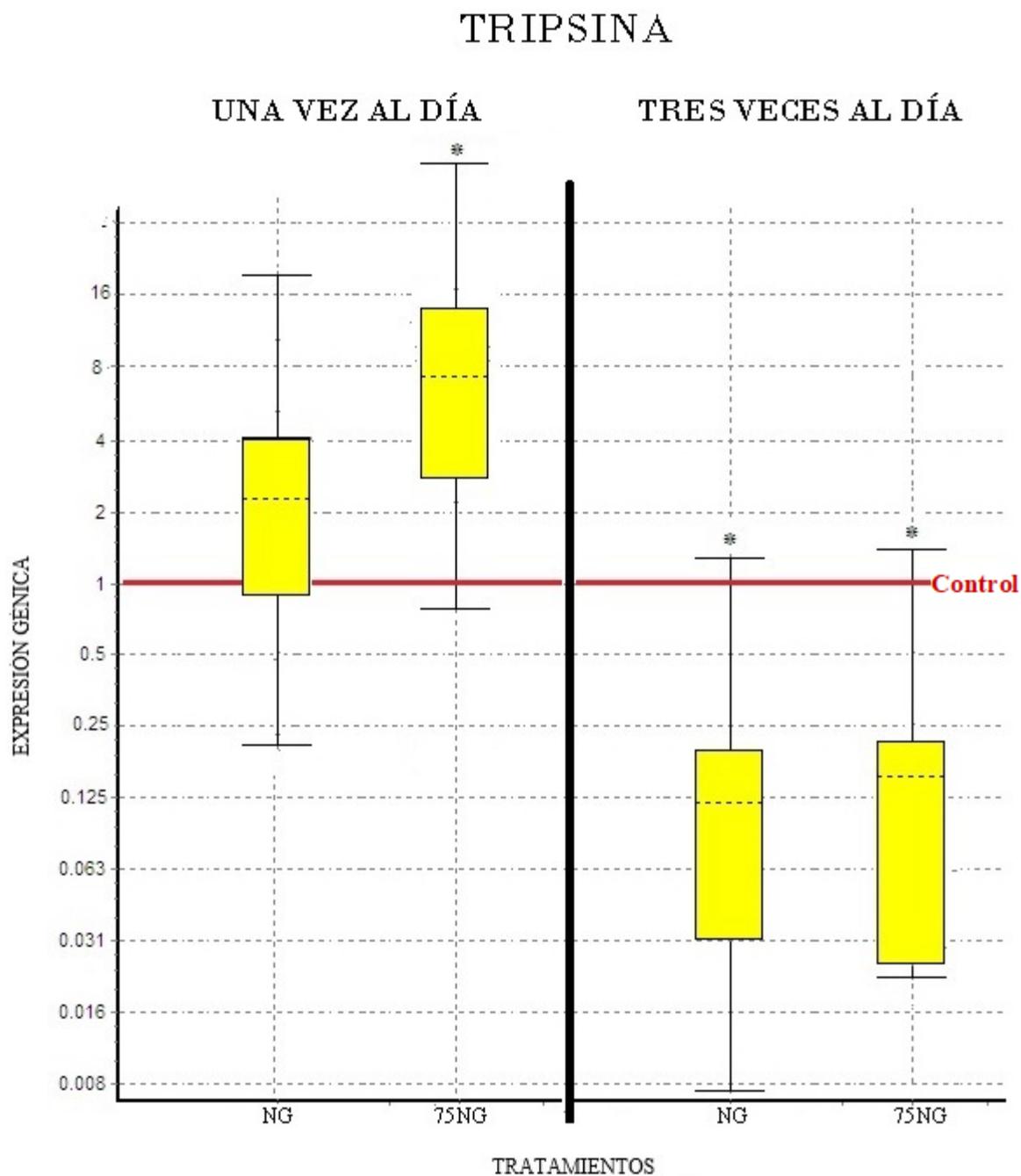
En los organismos alimentados con 75% de nematodos y 25% de *Artemia* tres veces al día fue significativamente más baja la expresión génica de la amilasa y tripsina en comparación con los animales del tratamiento control ( $P=0.012$ ;  $P=0.010$ , respectivamente). El suministro de la misma dieta solo una vez al día promovió una mayor expresión de la tripsina ( $P=0.008$ ).



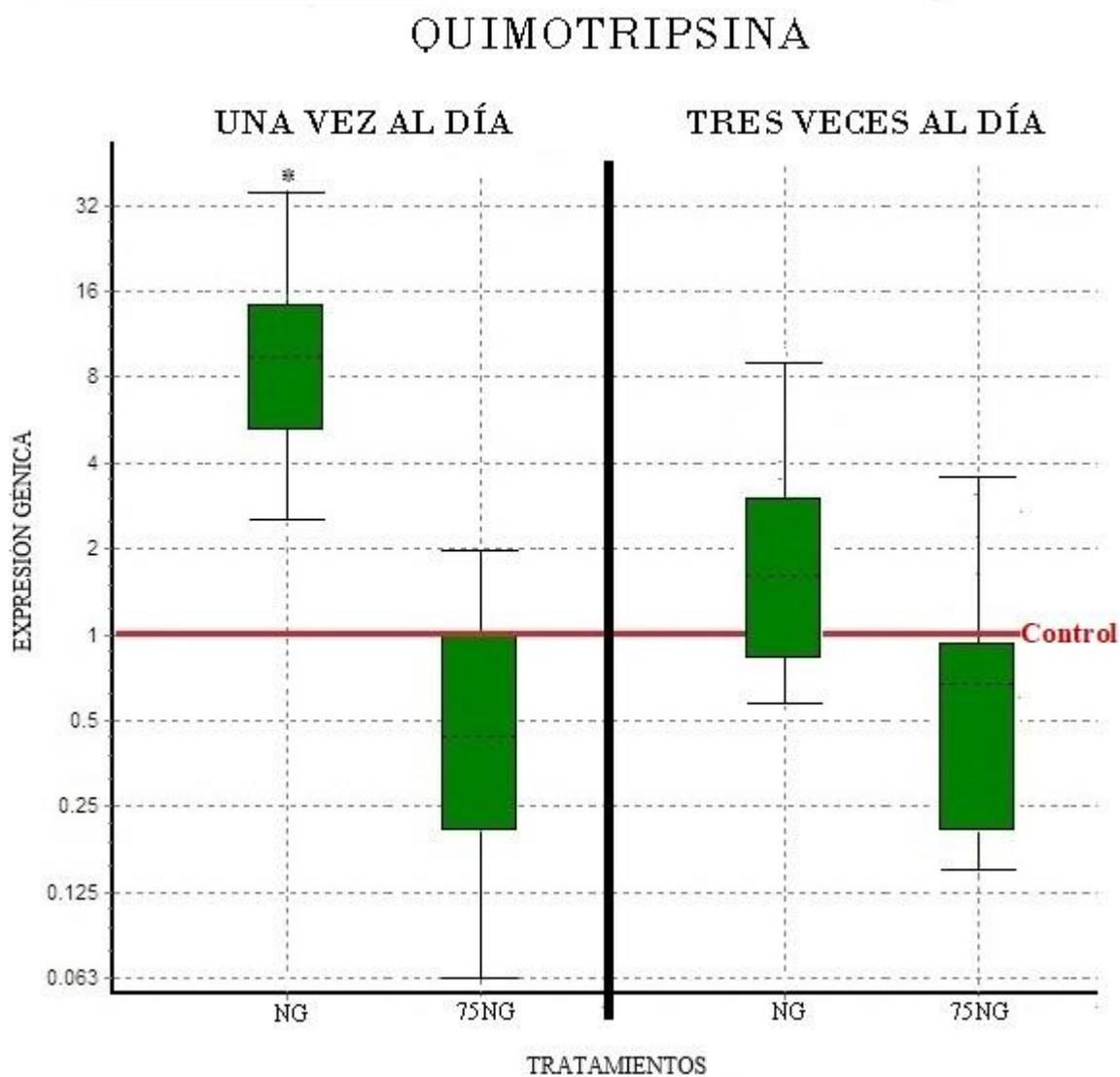
**Figura 16.** Expresión relativa del gen de la amilasa en PL.I de *L. vannamei* alimentadas con *Panagrolaimus* sp. suministrado a dos densidades y frecuencias. **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. La línea roja representa la expresión génica del grupo control (Larvas alimentadas con 100% *Artemia*). La significancia estadística se denota como\* **P<0.05**. Tamaño de muestras por tratamiento (n=3 “pool” de aproximadamente 85mg de larvas, a excepción de [NG 3 veces al día] n=2).



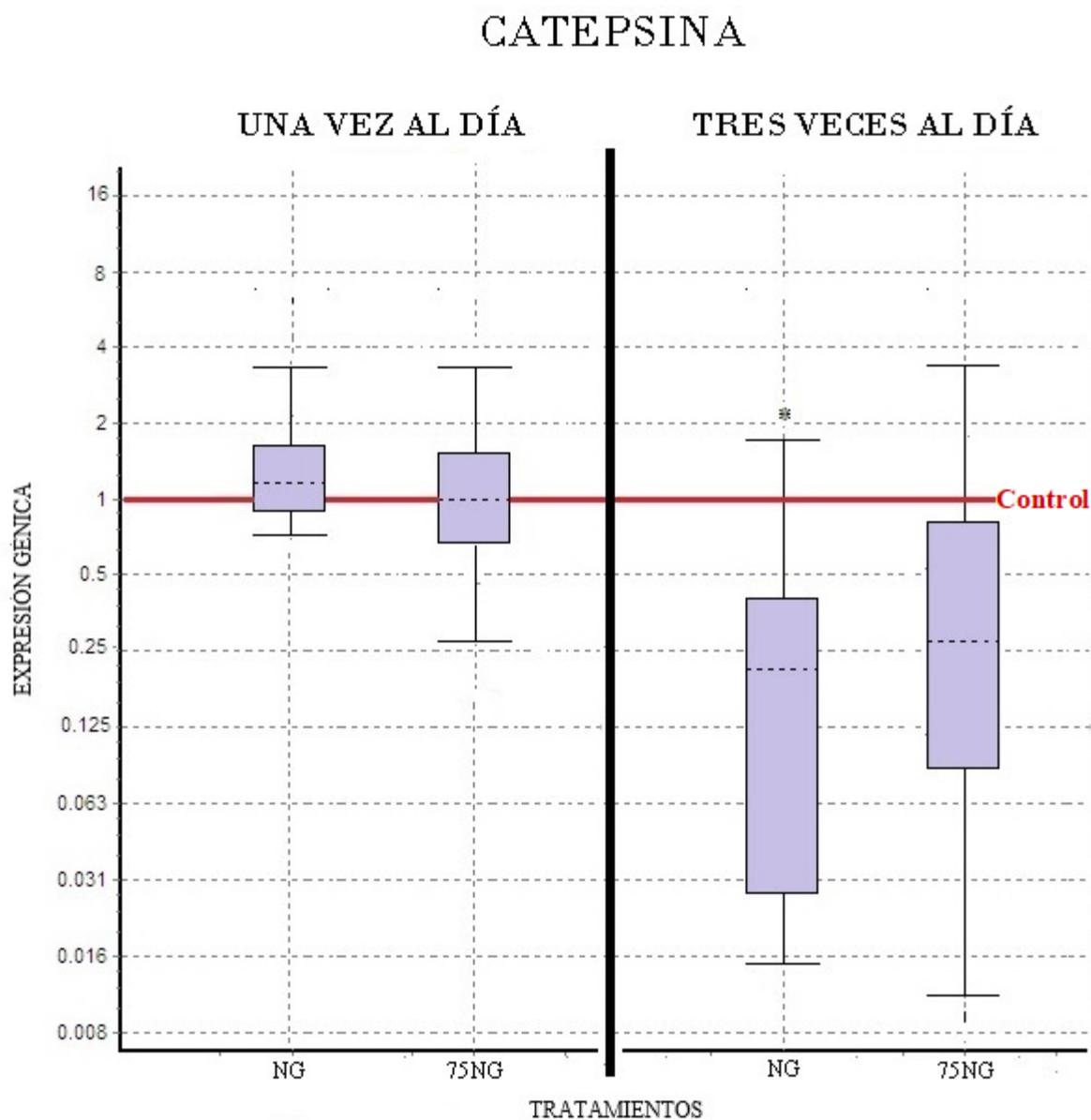
**Figura 17.** Expresión relativa del gen de la lipasa en PL.I de *L. vannamei* alimentadas con *Panagrolaimus* sp. suministrado a dos densidades y frecuencias. **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. La línea roja representa la expresión génica del grupo control (Larvas alimentadas con 100% *Artemia*). La significancia estadística se denota como\*  $P \leq 0.05$ . Tamaño de muestras por tratamiento (n=3 "pool" de aproximadamente 85mg de larvas, a excepción de [NG 3 veces al día] n=2).



**Figura 18.** Expresión relativa del gen de la tripsina en PLI de *L. vannamei* alimentadas con *Panagrolaimus* sp. suministrado a dos densidades y frecuencias. **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. La línea roja representa la expresión génica del grupo control (Larvas alimentadas con 100% *Artemia*). La significancia estadística se denota como \*  $P \leq 0.05$ . Tamaño de muestras por tratamiento (n=3 "pool" de aproximadamente 85mg de larvas, a excepción de [NG 3 veces al día] n=2).



**Figura 19.** Expresión relativa del gen de la quimotripsina en PL.I de *L. vannamei* alimentadas con *Panagrolaimus* sp. suministrado a dos densidades y frecuencias. **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. La línea roja representa la expresión génica del grupo control (Larvas alimentadas con 100% *Artemia*). La significancia estadística se denota como\*  $P \leq 0.05$ . Tamaño de muestras por tratamiento (n=3 “pool” de aproximadamente 85mg de larvas, a excepción de [NG 3 veces al día] n=2).



**Figura 20.** Expresión relativa del gen de la catepsina en PL.I de *L. vannamei* alimentadas con *Panagrolaimus* sp. suministrado a dos densidades y frecuencias. **NG.** Larvas alimentadas con 100% nematodos, **75NG.** Larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. La línea roja representa la expresión génica del grupo control (Larvas alimentadas con 100% *Artemia*). La significancia estadística se denota como\*  $P \leq 0.05$ . Tamaño de muestras por tratamiento (n=3 "pool" de aproximadamente 85mg de larvas, a excepción de [NG 3 veces al día] n=2).

**Cuadro 7. Matriz génica de significancia estadística ( $P < 0.05$  y  $P > 0.05$ ) de las enzimas amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina y catepsina en las dietas de 100% Nematodos y 75% Nematodos + 25% *Artemia***

Genes de enzimas digestivas	Tratamientos			
	1 vez / día		3 veces / día	
	100NG	75NG	100NG	75NG
Amilasa	0.001	0.517	0.011	0.012
Lipasa	0.012	0.063	0.853	0.427
Tripsina	0.255	0.008	0.003	0.010
Quimotripsina	0.001	0.100	0.146	0.264
Catepsina	0.370	1.000	0.026	0.065

- Aumento de la expresión  $P < 0.05$
- Disminución de la expresión  $P < 0.05$
- No hay diferencias, no hay una tendencia  $P > 0.05$

## DISCUSIÓN

### **Desempeño zootécnico de las larvas**

Los resultados del desempeño zootécnico mostraron que la sustitución del 75% de *Artemia* por el nematodo *Panagrolaimus* sp. en la dieta larvaria de *L. vannamei* es viable. Las diferencias de longitud total y peso seco entre las larvas alimentadas con 100% *Artemia* y aquellas cultivadas con 75% nematodos + 25% *Artemia* fueron mínimas (0.2mm y 5.4µg aproximadamente), aunque estadísticamente significativas en el caso de la longitud. Este resultado coincide con lo reportado por Seychelles y colaboradores (2017) quienes observaron larvas con un mismo peso seco y una longitud significativamente diferente (0.4mm), al comparar organismos alimentados con 100% *Artemia* con otros cultivados con 75% *Panagrolaimus* sp. enriquecidos en S.presso® (producto rico en ácidos grasos poliinsaturados) + 25% *Artemia*. En la presente investigación, las larvas alimentadas con 100% nematodos mostraron un menor crecimiento que las larvas del tratamiento control y las mantenidas con 75% nematodos + 25% *Artemia*. Estos resultados son similares a los presentados por Seychelles *et al.*, 2017 y Seychelles *et al.*, 2018, en donde registran una mayor longitud total en PL.I después de alimentar las larvas con 100% *Artemia* en comparación con 100% *Panagrolaimus* sp. enriquecidos con *C. cohnii*. Cabe mencionar que el peso seco promedio (43µg) que se obtuvo en la presente investigación para las larvas cultivadas con 100% nematodos es similar al reportado en el estudio de Seychelles y colaboradores (2017; 30µg) cuando probaron la misma dieta. No obstante, en otro estudio de este mismo equipo de trabajo, los pesos secos de las larvas oscilaron entre 47µg y 72 µg; eso hace pensar que dicha variable es fácilmente alterable por el proceso y material empleado para determinarla.

Una mayor disponibilidad de alimento en la columna de agua durante el día se reflejó en larvas más grandes, aunque este efecto solamente se observó para las larvas cultivadas con 100% *Artemia*, como lo evidencia la interacción. El tener solamente tres réplicas por tratamiento pudo haber enmascarado algunos efectos de las dietas y frecuencias de suministro sobre las variables zootécnicas en las larvas. El error estándar para dichas variables en

algunos tratamientos fue notable y es recomendable aumentar tanto el número de réplicas como tamaño de muestras para futuros bioensayos.

La supervivencia en el bioensayo fue muy baja y el resultado reportado carece probablemente de confiabilidad. El problema se atribuye más a la distribución no homogénea de las larvas en los estanques que al método empleado para determinar dicha variable. Las larvas no estaban repartidas de manera uniforme en la columna de agua; al contrario, se observaban “grupos” de organismos en diferentes partes de las unidades experimentales y a diferentes profundidades. Cabe mencionar que la distribución de los organismos es influenciada por las variables fisicoquímicas como la luz, temperatura y aireación, entre otros factores. También, dicha distribución cambia en función del estadio de desarrollo de la larva y su morfología. A PL.I, los organismos tienden a encontrarse en las paredes o en el fondo del estanque (Treece y Yates, 1993) y los pocos organismos que se capturaron en la columna de agua no fueron representativos de la población presente en las unidades. Para futuros bioensayos, sería conveniente considerar mejorar la dispersión de las larvas en la unidad experimental, lo cual podría lograrse al aumentar la aireación por unos minutos previo a la toma de muestras. También se debería tomar en cuenta nuevas técnicas para evaluar la supervivencia. Una de ellas, consiste en la toma de tres alícuotas de 100mL empleando un muestreador de vino (Godínez, comunicación personal). Otra propuesta que se ha considerado para futuros bioensayos, es el uso de un dispositivo inteligente contador de pequeños organismos acuáticos (XPert-Count<sup>TM</sup>), con el cual sería posible contabilizar a todos los organismos vivos de una misma unidad experimental.

Por último, en el presente trabajo la celeridad del desarrollo larvario no fue afectada por las frecuencias de alimentación ni por las dietas. Dicho resultado consolida la propuesta de reemplazar el 75% de *Artemia* por *Panagrolaimus* sp. en la primera alimentación del camarón blanco del Pacífico, ya que no se observa un retraso en el desarrollo de las larvas. Seychelles y colaboradores (2017) reportaron también que el porcentaje de organismos mudándose a PL.I no era estadísticamente diferente al cultivar larvas de *L. vannamei* con 100% *Artemia* o 75% *Panagrolaimus* sp. enriquecidos con S.presso® + 25% *Artemia*. En otro estudio (2018), este mismo grupo de investigadores encontró una tasa de desarrollo similar a PL.I entre organismos alimentados con 100% *Artemia* y otros mantenidos con 100%

*Panagrolaimus* sp. enriquecidos con *C. Cohnii*. En contraste, Focken y colaboradores (2006) observaron en un período de 9 días que aproximadamente el 72% de las larvas que consumieron el nematodo *P. redivivus* alcanzaron el estadio de PL.I en comparación con el 4% de las larvas alimentadas con *Artemia*. En los estudios anteriormente mencionados y en la presente investigación, no se calculó el índice de desarrollo larvario propuesto por Villegas y Kanazawa (1979) que tiene por finalidad determinar si un tratamiento alimenticio acelera o retarda la metamorfosis en cada estadio de la etapa larvaria. De tal forma que no se sabe exactamente como fue la evolución del desarrollo de las larvas antes de PL.I entre los diferentes tratamientos y si alguno lo aceleró o lo retrasó.

### **Composición bioquímica y estado nutricional de las larvas**

El reemplazo del 75% de *Artemia* por *Panagrolaimus* sp. no tuvo un impacto sobre la composición bioquímica de las larvas a PL.I, a excepción de la concentración de glucógeno. Lo anterior puede explicarse por la semejanza en la composición nutricional de estas dos presas vivas, aunque la *Artemia* tiene un mayor contenido en proteínas. Los resultados de análisis bromatológicos mostraron que *Panagrolaimus* sp. contiene aproximadamente 41% proteínas, 20% lípidos y 31% carbohidratos mientras que la *Artemia* empleada en el presente bioensayo tenía 54% proteínas, 16% lípidos y 23% carbohidratos (Mercier, comunicación personal).

Las proteínas son moléculas que desempeñan principalmente un papel en la estructura, señales bioquímicas, transporte, información genética y de defensa de los organismos (Nelson y Cox, 2005). Varios autores han mostrado que las proteínas son esenciales en juveniles de *L. vannamei* ya que son una fuente de energía por medio de reacciones catabólicas y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Rosas *et al.*, 2001). También, son involucradas en los procesos de osmoregulación a través de los aminoácidos, producto de su degradación (Dall y Smith, 1986; Lignot *et al.*, 1999). En larvas, las proteínas son usadas continuamente para el crecimiento. Velasco y colaboradores (2000) han sugerido que el requerimiento óptimo de este nutriente en la dieta de postlarvas de *L. vannamei* sea de 25%. La ausencia de diferencia estadística encontrada en el presente trabajo en la concentración de proteínas totales entre larvas alimentadas con 100% *Artemia* y 75%

nematodos + 25% *Artemia* demuestra que *Panagrolaimus* sp. puede ser considerado como un sustituto de la *Artemia*. Al no existir diferencias estadísticas de los niveles de lípidos y carbohidratos totales en las larvas alimentadas con las dietas usadas en el estudio, se apoya también la viabilidad de la sustitución del 75% de *Artemia*. Es importante mencionar que, en camarón, los lípidos representan una importante fuente de energía y son almacenados principalmente en el hepatopáncreas en forma de triglicéridos (Lim *et al.*, 1997); mientras que los carbohidratos son utilizados como combustibles metabólicos inmediatos (Sick y Andrews, 1973; Rosas *et al.*, 2000) y son también un constituyente del exoesqueleto (Rosas *et al.*, 2000, Rosas *et al.*, 2002). Los requerimientos nutricionales de lípidos y carbohidratos no han sido bien definidos en la etapa larvaria de los camarones peneidos; sin embargo, numerosos trabajos han mostrado la importancia de los ácidos grasos altamente insaturados tales como el DHA, ARA y EPA que forman parte de los lípidos. Dichos ácidos grasos son necesarios para un adecuado crecimiento larvario (González-Félix *et al.*, 2002; González-Félix, Pérez-Velázquez y Quintero-Álvarez, 2009). Por otro lado, Teshima y Kanazawa (1984) observaron que el uso de diferentes fuentes de carbohidratos (glucosa-sacarosa-almidón) en la dieta de larvas de *Penaeus japonicus* mejora el crecimiento y la supervivencia de estas.

La menor concentración de glucógeno registrada en las larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia* respecto a aquellas cultivadas con 100% *Artemia* puede ser explicada mediante los siguientes supuestos: 1) las larvas alimentadas con 75% nematodos + 25% *Artemia* probablemente no tuvieron la necesidad de almacenar glucógeno ya que tenían otras fuentes energéticas para ser usadas (lípidos y carbohidratos totales); 2) Es posible que las larvas mantenidas con 75% nematodos + 25% *Artemia* tenían pocas horas de haber mudado a PL.I antes del muestreo, mientras que las alimentadas con 100% *Artemia* habían alcanzado dicho estadio varias horas antes. Cabe resaltar que los crustáceos almacenan glucógeno (reserva energética) una vez que han satisfecho las necesidades de su metabolismo basal y después de haber dirigido energía hacia su crecimiento. Normalmente usan estas reservas cuando hay una escasez de alimento o en periodo de muda (Gaxiola *et al.*, 2005).

### **Expresión génica de las enzimas digestivas**

El suministro de 100% *Panagrolaimus* sp. una vez al día parece no ser adecuado para alimentar las larvas de *L. vannamei* ya que generó una sobreexpresión génica de la amilasa, lipasa y quimotripsina, implicando posiblemente un mayor desgaste energético. La distribución de los nematodos una vez al día produjo una menor disponibilidad de éstos en la columna de agua a lo largo del día, por lo que las larvas han probablemente capturado una gran cantidad de *Panagrolaimus* sp. en un corto tiempo, justo después de su suministro. La captura de un gran número de nematodos ha dificultado posiblemente su digestión por dos razones: 1) A PL.I, el hepatopáncreas sigue siendo rudimentario y es factible pensar que la secreción enzimática para degradar alimentos en el estómago no sea tan “potente”, por lo que se generó un “punto de saturación digestivo”; 2) *Panagrolaimus* sp. tiene una cutícula compuesta de 80% colágeno y 20% de otras glucoproteínas y lípidos (Page y Johnstone, 2007). La degradación de dicha cutícula por las larvas puede representar cierto grado de dificultad si no tienen las enzimas adecuadas. Para un futuro bioensayo, se sugiere medir la expresión del gen de la colagenasa para saber si dicha enzima está secretada por PL.I de *L. vannamei* y poder verificar la hipótesis planteada. En un trabajo, Brito y colaboradores (2001) previamente señalaron que la cutícula de algunos alimentos vivos como son los nauplios de *Artemia* puede representar un factor limitante para la digestión de las larvas de *L. vannamei*. La sobreexpresión observada en el presente estudio de algunos genes de enzimas digestivas, cuando las larvas fueron alimentadas con 100% nematodos una vez por día, parece no haber influenciado el crecimiento de los organismos o alguna otra variable de su desempeño zootécnico. En el caso del camarón tigre (*Penaeus monodon*), Sankar y colaboradores (2011) reportaron un mayor crecimiento en juveniles con niveles altos de actividad enzimática. No obstante, Molina y colaboradores (2000) no encontraron diferencias significativas en el peso y supervivencia de juveniles de *L. vannamei* a pesar de reportar un pico en la actividad de la amilasa (11.1U/mg de proteína) y la lipasa (96.8U/mg de proteína) en diferentes horarios de alimentación. De hecho, varios autores han evidenciado que existe una alta variabilidad en la actividad de las enzimas digestivas de los camarones peneidos en respuesta a una dieta, lo cual se relaciona con la expresión génica de las mismas (Lovett y Felder, 1990; Le Moullac *et al.*, 1994; Arena *et al.*, 2003). Dicha variabilidad puede ser producida directamente por factores relacionados al alimento como son: el contenido y la calidad de los carbohidratos y

proteínas; su naturaleza (vivo o inerte); su tamaño y densidad (Gamboa-Delgado, Molina-Poveda y Cahu, 2003; Le Moullac *et al.*, 1994). Otros factores externos a la dieta pueden también influir, tales como el estadio de muda del organismo, la hora del día, el fotoperiodo o la temperatura del cultivo (Van Wormhoudt, Ceccaldi y Martin, 1980; Le Moullac *et al.*, 1994; Cruz-Suárez, 1999).

## CONCLUSIONES

1. *Panagrolaimus* sp. puede ser empleado en la alimentación de las larvas de *L. vannamei* a una densidad de 75% nematodos + 25% *Artemia* al menos tres veces al día desde el estadio de Zoea II hasta PL.I.
2. El nematodo *Panagrolaimus* sp. es un alimento vivo con una composición nutricional indicada para la etapa larvaria de *L. vannamei*.
3. Las dietas suministradas y la frecuencia de alimentación no ejercieron un efecto sobre la metamorfosis larvaria, al menos no se observó a PL.I.
4. Una alimentación basada en 100% *Panagrolaimus* sp. probablemente provoca un desgaste a nivel energético en las larvas de *L. vannamei* porque implica una alta actividad metabólica su aprovechamiento nutricional, ya que los resultados de expresión génica señalan que es posible que sea más difícil digerirlo debido a su cutícula.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrunhosa F y Melo M. (2008). Development and functional morphology of the foreguts of larvae and postlarvae of three crustacean decapods. *Brazilian Journal of Biology*;68(1). pp.221-228.
- Andrade-Viscaíno K. (2010). Descripción del desarrollo larval del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) y evaluación del índice de desarrollo en función del régimen de alimentación. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México.
- Arellano E. (1990). Guías técnicas en el cultivo de larvas de camarón. En: Memorias de Edgar Arellano. Once años dedicados a la investigación y desarrollo de la acuicultura. (1993). ESPOL-CENAIM, San Pedro de Manglaralto, Ecuador. pp.53-86.
- Arena L, Cuzon G, Pascual C, Gaxiola G, Soyez C, Van Wormhoudt A y Rosas C. (2003). Physiological and genetic variations in domesticated and wild populations of *Litopenaeus vannamei* fed with different carbohydrate levels. *Journal of Shellfish Research*;22(1). pp.269-279.
- Ayala-Aguilar J. (2019). Suministro del nematodo *Panagrolaimus* sp. en el cultivo larvario del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México.
- Barnes H y Blackstock J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*;12. pp.103-118.
- Bastidas O. (2011). Conteo celular con hematocitómetro. [pdf]. Celeromics. Disponible en: <http://www.celeromics.com/2012/es/resources/Technical%20Notes/Como-contar-celulas-con-camara-de-Neubauer-Paso1.php> [Visitado el 13 de febrero de 2019].

- Biedenbach JM, Smith L, Thompsen TK y Lawrence AL. (1989). Use of the nematodes *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. *Journal of the World Aquaculture Society*;20(2). pp.61-71.
- Brito R, Rosas C, Chimal ME y Gaxiola G. (2001). Effect of different diets on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early post-larvae. *Aquaculture Research*;32. pp. 257-266.
- Brown RE, Jarvis KL y Hyland KJ. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Journal of Analytical Biochemistry*;180(1). pp.136-139.
- Brüggemann J. (2012). Nematodes as live food in larviculture-A Review. *Journal of the World Aquaculture Society*;43(6). pp.739-763.
- CONAPESCA, Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2016). Anuario estadístico de acuacultura y pesca de México. Sinaloa, México. pp.142-147.
- CONAPESCA, Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2017). Anuario estadístico de acuacultura y pesca de México. Sinaloa, México. p.27.
- Cortés E, Villarreal H y Rendón M. (2003). Efecto de la frecuencia alimenticia en el crecimiento y sobrevivencia de juveniles de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1968) (Decapoda: Parastacidae). *Revista Hidrobiológica*;13(2). pp.151-158.
- Crespo JE y Baessolo LA. (2002). Biogeografía y taxonomía del género *Artemia* (Crustacea anostraca) en Chile: Una Revisión. *Historia Natural*;1(4). pp.17-21.

Cruz-Suárez LE. (1999). Digestión en camarón y su relación con la formulación y fabricación de alimentos balanceados. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Mendoza-Alfaro R. (Eds.). Avances en nutrición acuícola III. (1999). Memorias del III simposium internacional de nutrición acuícola. Monterrey, Nuevo León, México. pp.207-232.

D'Abramo LR. (2002). Challenges in developing successful formulated feed for culture of larval fish and crustaceans. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Gaxiola-Cortés M. G, Simoes N. (Eds.). Avances en nutrición acuícola VI. (2002). Memorias del VI simposium internacional de nutrición acuícola. Cancún, Quintana Roo, México. pp.143-151.

Dai Y, Wang TT, Wang YF, Gong XJ y Yue CF. (2009). Activities of digestive enzymes during embryonic development in the crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda). *Aquaculture Research*;40. pp.1394-1399.

Dall W y Smith DM. (1986). Oxygen consumption and ammonia-n excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*;55. pp. 23-33.

de Swaaf ME, Pronk JT y Sijtsma L. (2003). Fed-batch cultivation of the docosaehaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. *Journal of Applied microbiology and Biotechnology*;61(1). pp.40-43.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018a). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, Italia. p.19.

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018b). Estadísticas de pesca y acuicultura. Producción mundial de acuicultura por grupos de especies [internet]. Disponible en [http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2016\\_USBcard/navigation/index\\_contact\\_aquaculture\\_s.htm#B](http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2016_USBcard/navigation/index_contact_aquaculture_s.htm#B) [Visitado el 6 de junio de 2018].

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018c). Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. [internet]. Disponible en [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es) [Visitado el 6 de junio de 2018].

Focken U, Schlechtriem C, von Wuthenau M, García-Ortega A, Puello-Cruz A y Becker K. (2006). *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquaculture Research*;37(14). pp.1429-1436.

Fontaine CT, Revera DB, Morales HM y Mock CR. (1982). Observations on the mass propagation of the common soil nematode *Panagrellus redivivus*, for use as foodstuff in penaeid shrimp hatcheries. NOAA Technical Report, National Marine Fisheries Service, Galveston Laboratory. Galveston, Texas, USA. pp.23.

Galgani FY, Benyamin Y y Van Wormhoudt A. (1985). Purification, properties and immunoassay of trypsin from shrimp *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry y Physiology*;81(B). pp. 447-452.

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

Gaxiola G, Cuzon G, García T, Taboada G, Brito R, Chimal M.E, Paredes A, Soto L, Rosas C y Van Wormhoudt A. (2005) Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*;140(A). pp.29-39.

González-Félix ML, Gatlin, DM, Lawrence A. y Pérez-Velázquez M. (2002). Effect of various dietary lipids on quantitative essential fatty acid requirements of juvenile

- pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 33(3). pp.330-340.
- González-Félix ML, Pérez-Velázquez M y Quintero-Álvarez JM. (2009). Effect of various dietary levels of docosahexaenoic and arachidonic acids and different n-3/n-6 ratios on biological performance of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, raised in low salinity. Journal of the World Aquaculture Society;40. pp.194-206.
- Guevara M y Lodeiros C. (2003). Composición bioquímica de nauplios de *Artemia* sp. (Crustacea, Anostraca) proveniente de la salina artificial de Araya, nororiente de Venezuela. Ciencias Marinas;29(4B). pp.655-663.
- Guillaume J. (1997). Protein and amino acids. En: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M. (Eds.). (1997). Crustacean Nutrition VI. World Aquaculture Society. Baton, Louisiana,USA. pp. 26-50.
- Honnens H y Ehlers RU. (2013). Liquid culture of *Panagrolaimus* sp. for use as food for marine aquaculture shrimp and fish species. Nematology;15. pp.417-429.
- Honnens H, Assheuer T y Ehlers RU. (2013). Desiccation and storage of *Panagrolaimus* sp. (strain NFS-24-5). Nematology;15. pp.557-566.
- Honnens H, Assheuer T y Ehlers RU. (2014). Enrichment of the nematode *Panagrolaimus* sp., a potential live food for marine aquaculture, with essential n-3 fatty acids. Aquaculture International;22(2). pp.399-409.
- Industria Acuícola. (2016). Estadísticas de producción de postlarvas de camarón en México durante 2016. Revista Industria Acuícola;13(1). pp.40.
- Kahan D, Bar-El T, Brandstein Y, Rigbi M y Oland B. (1980). Free living nematodes as a dietary supplement in the rearing of fish fry and hatcheries. En: Studies and Reviews.

- Vol.57. (1980). General Fisheries Commission for the Mediterranean. Rome, Italy. pp.67-78.
- Kumlu M y Fletcher DJ. (1997). The nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live feed for larval *Penaeus indicus*. Israeli Journal of Aquaculture;49. pp.12-18.
- Kumlu M, Fletcher DJ y Fisher CML. (1998). Larval pigmentation, survival and growth of *Penaeus indicus* fed nematode *Panagrellus redivivus* enriched with astaxanthin and various lipids. Aquaculture Nutrition;4. pp.193-200.
- Lavens P y Sorgeloos P. (2000a). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. Aquaculture;181(3-4). pp.397-403.
- Lavens P y Sorgeloos P (2000b). Experiences on importance of diet for shrimp postlarval quality. Aquaculture;191(1-3). pp.169-176.
- Léger P, Bengtson DA, Simpson KL y Sorgeloos P. (1986). The use and nutritional value of *Artemia* as food source. Oceanography and Marine Biology an Annual Review;24. pp.521-623.
- Léger P, Bengtson DA, Sorgeloos P, Simpsosn KL y Beck AD. (1987). The nutritional value of *Artemia*: A review. En: Sorgeloos, P, Bengtson, DA, Declair W y Jaspers, E. (Eds). (1987). *Artemia* research and its applications n.3. Universa Press. Wetteren, Belgica.pp.357-372.
- Le Moullac G, Van Wormhoudt A y AQUACOP. (1994). Adaptation of digestive enzymes to dietary protein, carbohydrate and fiber levels and influence of protein and carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). Aquatic Living Resources;7. pp. 203-210.

- Le Moullac G, Klein B, Sellos D y Van Wormhoudt A. (1996). Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amilase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*;208. pp.107-125.
- Lignot JH, Cochard JC, Soyez C, Lemaire P y Charmantier G. (1999). Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*;170. pp.79-92.
- Lim C, Ako H, Brown CL y Hahn K. (1997). Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. *Aquaculture*;151. pp.143-153.
- Lovett DL y Felder DL. (1990). Ontogenic change in enzyme activities of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea Decapoda). *Biology Bulletin*;178. pp.146-159.
- Luna-Figueroa J. (2009). Nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945): Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. *Investigación y Ciencia*;45. pp.4-11.
- Méndez M. (1981). Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapoda) del mar y ríos de la costa del Perú. Instituto del mar del Perú. *Boletín*;5. pp.170.
- Moens T y Vincx M. (1997). Observations on the feeding ecology of estuarine nematodes. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*;77(1). pp.211-227.
- Molina C, Cadena E y Orellana F. (2000). Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA y Civera-

- Cerecedo R. (Eds.). Avances en nutrición acuícola V. (2000). Memorias del V simposium internacional de nutrición acuícola. Mérida, Yucatán México. pp.358-380.
- Muhammad F, Zhang ZF, Shao MY, Dong YP y Muhammad S. (2012). Ontogenesis of digestive system in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea: Decapoda). Italian Journal of Zoology;79(1). pp.77-85.
- Navarro JC, Henderson RJ, McEvoy LA, Bell MV y Amat F. (1999). Lipid conversions during enrichment of *Artemia*. Aquaculture;174(1-2). pp.155-166.
- Nelson DL y Cox MM. (2005). Lehninger. Principios de bioquímica. Cuarta edición. Editorial OMEGA. New York, USA.
- Page AP y Johnstone IL. (2007). The cuticle. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. [internet]. Disponible en <http://www.wormbook.org>. [Visitado el 6 de junio de 2018].
- Palacios GE y Vega EJ. (1999) Sustitución de *Artemia* por nematodos en la alimentación de postlarvas (Pl 1 a Pl 10) del camarón marino (*Penaeus vannamei* BOONE 1936). Uniciencia;15(16). pp.49-55.
- Pérez-Farfante, I. (1969). Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. Fishery Bulletin;67(3). pp.461–591.
- Pérez-Farfante I y Kensley, B. (1997) Keys and diagnoses for the families and genera. Penaeoid and sengestoid shrimps and prawns of the world. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle. pp.23.
- Persoone G y Sorgeloos P. (1980). General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. En: Persoone G, Sorgeloos P, Roels O y Jaspers E (eds.). The brine shrimp *Artemia*. Vol. 3.1980 Universa Press, Wetteren, Bélgica. pp.3-24.

- Pfaffl MW, Horgan GW y Dempfe L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. *Nucleic Acids Research*;30(9): e36. pp.1-10.
- Pfaffl MW. (2004) Quantification strategies in real-time PCR. En: *A-Z of Quantitative PCR*. S.A. Bustin editor. International University Line. La Jolla, California, USA. pp.87-112.
- Platas D y Vilaboa J. (2014). La Acuicultura mexicana: potencialidad, retos y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Agronegocios*;35. pp.1065-1071.
- Ricci M, Fifi AP, Ragni A, Schlechtriem C y Focken U. (2003). Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*;60. pp.556-559.
- Rivera-Pérez C. (2010). Lipasas en *Penaeus vannamei*: genes y proteínas involucradas en la hidrólisis de triacilglicéridos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, B.C.S., México.
- Rodríguez A, Le Vay L, Mourente G y Jones DA. (1994). Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. *Marine Biology*;118. pp.45-51.
- Roe JH. (1955). The determination of sugar in blood and spinal fluid with antrone reagent. *Journal of Biological Chemistry*;212(1). pp.335-343.
- Rosas C, Cuzon G, Gaxiola G, Arena L, Lemaire P, Soyez C y Van Wormhoudt A. (2000). Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*;249. pp.181-198.

- Rosas C, Cuzon G, Taboada G, Pascual C, Gaxiola G y Van Wormhoudt A. (2001). Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquaculture Research*;32. pp.531-547.
- Rosas C, Cuzon G, Gaxiola G, Pascual C, Taboada G, Arena L y Van Wormhoudt A. (2002). An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*;268. pp.47-67.
- Rouse DB, Webster CD y Radwin IA. (1992). Enhancement of the fatty acid composition of the nematodes *Panagrellus redivivus* using three different media. *Journal of the World Aquaculture Society*;23. pp.89-95.
- Sainz JC y Cordova JH. (2009). Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*;290. pp.190-195.
- Salazar A, Sandoval A y Armendáris J. (2013). *Biología molecular, fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Primera edición. Editorial Mc Graw Hill Education. Ciudad de México, México. pp.66-73, 145.-150.
- Samocha T y Lewinsohn CH. (1977). A preliminary report on rearing penaeid shrimp in *Israeli Journal Aquaculture*;10. pp.291-292.
- Sankar G, Elavarasi A, Sakkaravarthi K y Ramamoorthy K. (2011). Biochemical changes and growth performance of black tiger shrimp larvae after using *Ricinus communis* extract as feed additive. *International Journal of PharmTech Research*;3(1). pp.201-208.

- Santiago CB, Ricci M y Reyes-Lampa A. (2003). Response of biohead carp *Aristichthys nobilis* and Asian catfish *Clarias microcephalus* larvae to free-living nematode *Panagrellus redivivus* as alternative feed. *Journal of Applied Ichthyology*;19. pp.239-243.
- Sautter J, Kaiser H, Focken U y Becker.K. (2007). *Panagrellus redivivus* (Linne) as a live food organism in the early rearing of the catfish *Synodontis petricola* (Matthes). *Aquaculture Research*;38. pp.653-659.
- Seychelles LH, Mercier L, Holmer S, Wittke M y Ehlers RU. (2017). A desiccation-tolerant nematode as live feed for *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. *Aquaculture Research*;48. pp.5146-5149.
- Seychelles LH, Happe S, Palacios E, Ludwing M, Hollmer S, Ehlers RU, Schulz C y Mercier L. (2018). Successful rearing of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae, using a desiccation-tolerant nematode to replace *Artemia*. *Aquaculture Nutrition*;24(2). pp.903-910.
- Sick LV y Andrews JW. (1973). The effect of selected dietary lipids, carbohydrates and proteins on the growth, survival and body composition of *Penaeus duorarum*. *Journal of the World Mariculture Society Workshop*;4(1-4). pp.263-276.
- Silva A y Velez A. (2013). Alimentación larvaria. Producción de alimento vivo. En: Castello F. *Piscicultura marina en Latinoamérica, bases científicas y técnicas para su desarrollo*. (2013). Universidad de Barcelona. Barcelona, España. pp.107-108.
- Sorgeloos P, Coutteau P, Dhert P, Merchie G y Lavens P. (1998). Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in larval crustacean nutrition: A Review. *Fisheries Science*;6. pp.55-68.
- Sorgeloos P, Dhert P y Candreva P. (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*;200(1-2). pp.147-159.

- Tabb DC, Yang WT, Hiromo Y y Heinen J. (1972). A manual for culture of pink shrimp, *Penaeus duorarum*, from eggs to postlarvae for stocking. University of Miami, Sea Grant, Special Publication. Miami, Florida. USA. pp.34-46.
- Tackaer W y Sorgeloos P. (1993). The use of brine shrimp *Artemia* in biological management of solar saltworks. In: Seventh Symposium on Salt (1993). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands. pp.617-622.
- Tacon AGJ, Cody JJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP y Decamp OE. (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*;8. pp.121-137.
- Tamay de Dios L, Ibarra C y Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Revista de Investigación en Discapacidad*;2(2). pp.70-78.
- Teshima SI y Kanazawa A. (1984). Effects of protein, lipid and carbohydrate levels in purified diets on growth and survival rates of the prawn larvae. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*;50(10). pp.1709-1715.
- Treece GD y Yates ME. (1993). Laboratory manual for the culture of penaeid shrimp larvae. Marine advisory service. Sea Grant College program. Texas A y M University. Bryan, Texas, USA. pp.10-12.
- Triantaphyllidis GV, Abatzopoulos TJ y Sorgeloos P. (1998). A review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *Journal of Biogeography*;25. pp.213-226.
- Tsai IH, Chuang KL y Chuang JL. (1986). Chymotrypsin in digestive tract of crustacean decapods (shrimps). *Comparative Biochemistry y Physiology*;85(B). pp.235-2239.

- Vandenbergh J, Thompson FL, Gomez-Gil B y Swings, J. (2003). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*;219. pp.9–20.
- Vanhaecke P y Sorgeloos P. (1980). International study of *Artemia*. IV. The biometrics of *Artemia* strains from different geographical origin. En: The brine shrimp *Artemia*, Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren. pp.393-405.
- Vanhaecke P, Lavens P y Sorgeloos P. (1983). International studie on *Artemia* XVII. Energy consumption in cysts and early larval stages of various geographical strains of *Artemia*. *Annales de la Société Royale Zoologique Belgique*;113. pp.155-164.
- Vanhaecke P, Tackaert W y Sorgeloos P. (1987). The biogeography of *Artemia*: an updated review. En: Sorgeloos P, Bengtson DA, Decler W, Jaspers E. (Eds). *Artemia* research and its applications, Vol.1. (1987). Morphology, Genetics, Strain Characterisation, Toxicology. Universa Press, Wetteren, Belgium. pp.129-155.
- Van Handel E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Journal of Analytical Biochemistry*,11(2). pp.256-265.
- Van Wormhoudt A, Ceccaldi HJ y Martin B. (1980). Adaptation of the level of hepatopancreatic digestive enzymes in *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda) to the composition of experimental diets. *Aquaculture*;21. pp.63-78.
- Van Wormhoudt A y Sellos D. (1996). Molecular cloning and sequencing of three cDNAs that encode amylase in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Molecular Evolution*;42. pp.543-551.
- Van Wormhoudt A, Le Moullac G, Klein B y Sellos D. (1999). Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): adaptación a la composición del régimen alimenticio. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Mendoza-

- Alfaro R. (Eds.). Avances en nutrición acuícola III. (1999). Memorias del III simposium internacional de nutrición acuícola. Monterrey, Nuevo León, México. pp.233-250.
- Velasco M, Lawrence AL, Castille FL y Obaldo LG. (2000). Dietary protein requirement for *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA y Civera-Cerecedo R. (Eds.). Avances en nutrición acuícola V. (2000). Memorias del V simposium internacional de nutrición acuícola. Mérida, Yucatán, México. pp.181-192.
- Villegas CT y Kanazawa A. (1979). Relationship between diet composition and growth rate of the zoeal and mysis stages of *Penaeus japonicus* Bate. Fisheries Research Journal of the Philippines;4(2). pp.32-40.
- Webster C y Lovell R. (1990). Quality evaluation of four sources of brine shrimp *Artemia* spp. Journal of the World Mariculture Society;21(3). pp.31-49.
- Wei J, Zhang X, Yu Y y Li F y Xiang J. (2014). RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics;11. pp.37-34.
- Wilkenfeld JS, Lawrence AL y Kuban FD. (1984). Survival, metamorphosis, and growth of penaeid shrimp larvae reared on a variety of algal and animal foods. Journal of the World Mariculture Society;15. pp.31-49.
- Winkler FK, D'Arcy A y Hunziker W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. Nature International Journal of Science;343. pp.771-774.
- Wurtsbaugh WA y Gliwicz ZM. (2001). Limnological control of brine shrimp population dynamics and cyst production in the Great Salt Lake, Utah. Hydrobiologia;466. pp.119-132.

## **ANEXO 1.** Guía para la obtención de ARN utilizando el kit FastRNA progreen (MP Biomedicals®)

1. Por cada 100-300mg de muestra para procesar, añadir 1mL de la solución RNApro™ y Lysing Matrix D.
2. Añadir de 100-300mg de tejido vegetal o hasta 100mg de tejido animal al tubo que contiene la solución RNApro™ y Lysing Matrix D.
3. Procesar el tubo de la muestra en el quipo FastPrep®-24 durante 40s a una configuración de 6.0.
4. Retirar y centrifugar el tubo a un mínimo de 12,000 x g durante 5min a 4°C.
5. Transferir la parte superior (-750µL) a un nuevo tubo de microcentrífuga. Evitar transferir el pellet o pastilla de desechos y la Lysing Matrix D.
6. Incubar la muestra transferida en el nuevo tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 300µL de cloroformo (no alcohol isoamílico) y vortexear durante 10s, después dejar incubar durante 5min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar el tubo a un mínimo de 12,000 x g durante 5min a 4°C.
9. Transferir la parte superior (sin perturbar la interfase) a un nuevo tubo de microcentrífuga.
10. Añadir 500µl de etanol absoluto frío, invertir 5X para mezclar y almacenar a -200°C durante al menos 30min.
11. Centrifugar el tubo a un mínimo de 12,000 x g durante 15min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
12. Lavar el pellet o pastilla con 500µl de etanol al 75% frío. (Debe de estar hecho con agua DEPC)

13. Eliminar el etanol y dejar secar durante 5min a temperatura ambiente (No secar por completo el ARN), resuspender el ARN en agua DEPC.

14. Dejar incubar durante 5min a temperatura ambiente.

15. Determinar la concentración de ARN:

- Diluir 5µl de ARN purificado en 495µL de agua DEPC.
- Lectura de OD<sub>260</sub> usando agua DEPC como blanco.
- Calcular los µg de ARN por mL usando la fórmula:

$$(\text{OD}_{260}) (40\mu\text{g/mL/por OD}) (100 [\text{factor de dilución}]) = \mu\text{g ARN por mL.}$$

16. Repartir el ARN en alícuotas y guardar a -70°C.

17. La integridad del ARN puede observarse mediante la electroforesis usando gel de agarosa al 1.2%.

## ANEXO 2. Guía para la conversión de ARN en ADNc empleando al kit ImProm-II™ reverse transcription system (Promega®)

El procedimiento está diseñado para convertir hasta 5µg de ARN total o hasta 500ng de ARN poli(A) en ADNc de primera cadena.

1. Mezclar y centrifugar cada componente antes de ser utilizado. Debe de ser combinado lo siguiente:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
ARN muestra (hasta 5µg/reacción)	XµL
Primer Oligo dT (0.5µg/reacción) y/o	
Primer random (0.5µg/reacción) y/o	
Primer de gen específico (10-20pmol/reacción)	XµL
Agua libre de nucleasas	XµL
<b>Volumen final</b>	<b>5µL</b>

2. Cerrar cada tubo de ARN y colocar los tubos en un bloque de calor precalentado a 70°C durante 5 minutos. Después de manera inmediata enfriar los tubos en agua con hielo al menos durante 5 minutos. Centrifugar cada tubo durante 10s en una microcentrífuga. Deben de mantenerse cerrados los tubos y en hielo hasta que se les agregue la mezcla de la reacción de Transcriptasa-Reversa.
3. Preparar la mezcla para la reacción de Transcriptasa-Reversa empleando los siguientes componentes:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Agua libre de nucleasa (para volumen final de 15mL)	XmL
Buffer 5X GoScript™	4.0µL
MgCl <sub>2</sub> (concentración final 1.5-5.0mM)	1.2-6.4µL
dNTPs (concentración final 0.5mM)	1.0 µL
RNAsin (opcional)	20U
Transcriptasa-Reversa GoScrip™	1.0µL
<b>Volumen Final</b>	<b>15.0µL</b>

4. Añadir 15mL de la reacción Transcriptasa-Reversa a cada tubo en el hielo. Agregar 5µL de ARN y mezcla de primer o cebador para obtener una reacción con un volumen final de 20µL por tubo.

5. Colocar los tubos en un bloque térmico a 25°C durante 5min.

6. Incubar los tubos en el bloque térmico a 42°C hasta 1h. La temperatura de extensión se optimizará entre 37°C y 55°C.

7. Inactivar Transcriptasa-Reversa: incubar los tubos en el bloque térmico a una temperatura de 70°C durante 5min.

### ANEXO 3. Secuencias génicas de los oligonucleótidos empleados para la evaluación de la actividad de las enzimas digestivas

#### □ Amilasa

>KM077129.1 *Litopenaeus vannamei* isolate amy\_lv\_d1 amylase mRNA, complete cds  
 CAGCATCATGGGTTTCGGCAGGACTGTACAGCTTGGTGTGGTGTGCTGTGGGCGGGCGGGCGGTGCC  
 GGCGTCGGCTACGAGAACCCCGCGTGCACGGCAAGACGGTCATCGTGCACCTGTTTCGAGTGGAGGTGGA  
 CCGACGTCGCCCCGAGTGCAGAGAGTTCCCTCGCCACGCCGGCTACTGCGGCGTCCAGGTGTCCCCC  
 GAACGAGCACCTGACGAACCCGCCGAGTACCCGTACCCGTGGTGGCAGCGATACCAACCCGTCTCGTAC  
 AAGCTCGTCTCGCGGTCCGGCTCCGAGGACGAGTTCGAGGACATGGTGCAGGTGCAACGCCGTCCGGG  
 TCAGGATCTTCGTGACGCGCTAGTGAACCACATGGCCGCCCTGGGACGCAAGGGGACGGGCTCCGGCGG  
 GACGGCCCTTCGACGGCGACGCCACGACTTCCCCGGCGTCCCCTACACCGCCGAGCATTACGCCCAAG  
 GAGCTGTGCCCTTCGCATGACGGCAACGTGAACAACCTACGGCGACCCGTTCAACGTTTCGCAACTGCAACC  
 TCGTGGCTCTCACCAGCTCTACGGCGCCTCGGACTACGTGAGGACGACCGTGGCCGGATATTTTCAGCAA  
 GTTGGTGGACATCGGAGTGGCCGGCTTCAGGGTGGACGCGGGCAAGCACATGTGGCCGGAGGACCTGGCA  
 GCCATGATGGACCTGACCAACGACCTGAACCCGCCAGGGCTTCCCCGCCAACACCCGCCCTTTTTTCT  
 ACCTGGAGGTCATAGATCGCAACGACGGGGCGGTACAGTGCAGGAGTACTATGGCATGGGTTCGCGTGAC  
 GGAATTCGCTACAGCCAGAAGATCGCTTGGGGCGTGCAGAACCCGGGGCAGCTGGAGGGCGTGTATGAC  
 CCGGGCTGGGGCATGGCTGACCCCGACAAGGCCTTCGTGTTCGTGACAAACCACGACAACCAGCGCGGTC  
 ATGGAGGCGCCGGGACATCCTCACGCACAAGCAGCCTAAGGAATATACCATGGGTGTCTGCTTCTCCCT  
 CGCCCATGACTATGGTTTTTCATGCGCATCATGAGCAGCTATTACTTTCGACAACAGCGACCCAGGGTCCGCCA  
 GGCAGCAGCTACGGAGGCACGGATGACGTCCCCATCAACGGCGATGGAACCTGCGGCGGGCGGATGGGTCT  
 GCGAGCACCGGTGGAACGCCATTACGCAGATGGTCAAGTTCAGGAACGCTGTGGCAGGCACGCAGATCGC  
 CAACGGTTCAGGAGGGCGACAACGTGGCTTCTCCCCGCGGCGATAAGGGCTTCTTCGCCATGTCCAAG  
 TACGGCTCTTTCGACCGTACGCTCCAGACGGGCATGCCCGCCGGTACCTACTGCGAGCTGATCAGCGGCT  
 GCGC**CAATCAGGTGACGGTGAAC**GGCGACGGAATGCGCAGATCTCCATCCACAATTTCTGATGAACCGAT  
 CTTCGCCATTTGTGTTCGGATGCGACGGAATGGCCCCACCGTCCGACCCCAATCAGCCACGACGACCCCG  
 GGCCCCACCCAGCCGCCATCACGTCCGGCGCGCACAGGACC**GTCGTCTTCGTCCACAAG**CAGACCAACC  
 CCGGCCAGGACCTTTCATAAGGGGCGGCATCGACTCGGCCCATCGCCAGGCTGCACCGAGAACCGCGGA  
 CGCCGACGCTGCGCCATCGACATCGCCGTACGACGCTCGGCGCCGACGCCACTACGCCAAGTACGAC  
 GCGTGGCGAGTCGGCGACACGAAGCTGGACTGGTACGGCGGGCAGGGCGGCCAGGGCAGCTACATGGGGC  
 AGGCGGCTCCGGTTCGCCGCTTGCTGGACCACCAGCCAGGTCGGGGGGCGTGGACACCAGGATCTGAA  
 TACCTTTGGCGAACACTACTGGATGATTGACATGGAAAATGGATTGCGGTCAGACTGAAGGCGGGTGGTTT  
 GAGCTCAAGGCCCTTCTGACCAACGCCGGGTCCGGCTGGGAAGCGGACATCAACCAGGTGAGCTCTTGCA  
 AGGGAAGCGCGGAGGCTCCAAGCCCTACGCGTCAACAACACATGGGAAAGTGGCGCTTCTCAATGT  
 CTTCGAGTTCTCGGGTTCCTCGTGCCAGATCGACGTTCTGCCCTGAGTCCGCTCTGAGCTCTTGGGGCGA  
 CGACGATGAAGGTGACGACGGCGGCGACGATGATGAAAAGACAGTATGATAAGGATGACGATGAAGATG  
 ACGACGACGATGATGGGAAGACGATGGTGAAGTGAAGACGACGGTGAAGATGATGATGAAAAGACAATG

#### □ Lipasa

>KJ013599.1 *Litopenaeus vannamei* pancreatic lipase (PL) mRNA, complete cds  
 GATACCAGAACAAGAACTGGTTGAGTGAACCTCGTCAATCTCTGAAAACCTCCAGATAAAAGAAAAAAA  
 GTTTATCTTAGTCACTGTCTTTCTGTTCAGTATTTTTCAAGGTTGTATAATTTGTTACGGTATAGGCTCTA  
 AGCAGACTTACTGACACTCCATGACGCGATACTCACTGAACTGAAACAATATTCGATCTTCCACTTTCAC  
 TGATTAATTCGAGATTTCGTTGTTGCATCCACGCCACTTTTCCATCCGCATCACGAACGGTTGAAGGCAT  
 CCAAAAAAGAACCAAGCGCGCAAGATGCCGGCCATCGGAGCAACGAAGGGGGCCGTGCTATTTCCACCTCC  
 TGAACATAAACCTGCTGATGGACCTGGGCGCCCCGCCGCCGACCCCGTCCGAGCCCCGCCGTCTCATC  
 CAACGTGGAGGAAGTTTGCCACATTTGTGTACGGCCAAAGACTTGCTTCTCTATGACCGACCTTGGTTTC  
 TCTTCGTACGTCCTGTGGTGAARGCGCCATGTCRCCCAGGAGCTTGGCACTTCTTTCACGCTCTTCA  
 CTCGCCGTAACGACACCTTTCTGCGACCTTGACCCCGGCGACCTCAACACCATCGTCAACGCGCCCTT

CATCCCGGAAAAGCCCTTCAAGGTGGTCACGCACGGCTACCTCTCCTACGGCGCCGTGCGGTGGATAAAG  
 ACGATGACGGGCGAGCTCCTCCGATCGGCCGACCAGAACGTGATCGTGGTGGACTGGGGCGTGGGCGCCA  
 GGCTCCGTACACGCAGGCCGTGGCCAAACATCCGCATGGTGGCCTCGCAGCTCGCTACCTCATCTACCT  
 GTTCAATAAGTTCGCCGACGTCCCGGTCTCCTCCGTCCACCTCATCGGCCACAGCCTCGGCGCGCACATG  
 TCCGGCCACACGGGGACCTACCTCAAGAAAATCTACGGACTCACGCTGCCCCGAATCACCGGCTGGACC  
 CCGCCGAGCCCTACTTCAACGACACCCACCCGGTGACCCGACTCGACACGACTGACGCCGACTTCGTTGA  
 CATCATCCACACCGACGACTCCCCAATCCTCGGCTTCCCGCTCAGCGTGGGCATGACGCAGCCCATCGGC  
 CACCTCGACTTCTTCCCCAACGGAGGACACAACCAGCCGGGCTGCATGGGTGACGTCAACTGCCAGCACC  
 GGCGCGGATCACCTATTTACGGAATCCATCAGGCAGTCTTGTCCCATGATAGGTGTTGCCTGCCCATC  
 ATACGGAGAGTTTATAGATGGTACTGCTGGGGTGTGACGACGAGCACCCCTTGTTCCTACATGGGGTTG  
 GACGCCGCGCTCTGCCCTCACAGCCAGACTCACAAACTCTATCTTCATACATGGGAACGCAGCCCGT  
 TCTGTGGCTACCACTACCGCGTGACTGTGGAATTCAGCAACTCCACTGAGGCTCAGGAGAAAATGGGGGA  
 GTTTGGCATCATCCACCTCAGACTCACCGGAATAAGGACAAGTCGCCACCGATCAAGCTGTCTGAAAAA  
 TCGAAGTACTACGAAGCCGGCTCAGTGCACCGCCGTGTTATCCTGACCCACGACATCGGTGACCTGCAGA  
 CGATGGGCGTGACCTCGAGTACCAAGGTCAATCATGTCTTGGGTCCGCCCGAAAAGCCAACCTTCTT  
 CCTGGAATCCATCACCCTCGAGCCTCTCGGGGAAAAACAGAAAGTGGAAAGTACTGCATGGCAGAACCGCTC  
 CAGAAGAGCGGCTACGAGTACATTTCTTCGTCAAAAACAGTCGTGTTAAGTGCCTGAACCATAGTAAAAA  
 AAA

## □ Tripsina

### >X86369.1 *P.vannamei* mRNA for trypsin

CCATGAAGACCTCATCCTCTGTGTGCTCCCTTGCTGGAGCTTTTGCCGCCCCCTCCAGGAAGCCCACCTT  
 CCGCCGCGGTCTCAACAAGATCGTCGGAGGAACTGACGCCACTCCCGGAGAGCTGCCTTACCAGCTCAGT  
 TTCCAGGACATCTCCTTCGGCTTTGCGTGGCACTTCTGCGGGCGCCTCCATCTACAACGAGAACTGGGCCA  
 TCTGCGCCGGCCACTGCGTCCAGGGCGAGGACATGAACAACCCCGATTACCTTCAGGTCGTTGCCGGAGA  
 ACTTAACCAGGATGTGGATGAGGGCACCGAGCAGACGGTCATCCTCTCCAAGATCATCCAACACGAGGAC  
 TACAACGGCTTACCATCAGCAACGACATCTCCCTGCTCAAGCTGTCTCAGCCCTCTGAGCTTCAATGACA  
 ACGTTCGCGCATCGATATTTCCCGCTCAGGGTACGCTGCCTCTGGCGACTGCATCGTCTCCGGCTGGGG  
 CACCACCTCCGAGGGAGGAAGCACCCCAAGTGTCCCTGCAGAAAGGTGACCGTTCATCGTGTCTGACGAC  
 GAGTTCGCGATGCTTATGGCCAGAGCGACATTCAGGACTCCATGATCTGTGCCGGAGTGCCCGAGGGCG  
 GCAAGGACTCGTCCAGGGTGACTCTGGCGGCCCTTGGCTGCTCTGACACGGCCCTCCACTACCTGGC  
 CGGCATCGTGTCTGGGGCTACGGCTGTGCCCGTCCCGGCTACCTGGCGTGTACGCTGAGGTCTCCTAC  
 CATGTGATTTGGATTAAGGCCAATGCTGTTAATCAAGTTGTTAATCATGTACTTACCTTGAAAGCAATA  
 AAGAAAAAATATA

## □ Quimotripsina

### >X66415.1 *P.vanameii* mRNA for chymotrypsin 1

GGTAAACGGCGGGAGTAACTATGACTCTCTTAAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCG  
 ATGAATGGATTAACGAGATTCCCACTGTCCCTACCTACTATCTAGCGAACCCACAGGGCAGGTGCGCCAGG  
 ATGATCGGAAAGCTCTCACTCCTCCTCGTCTGCGTCGCCGTGCGCCAGCGGAAACCCCGCCGCGGGGAAGC  
 CATGGCACTGGAAGTCCCCGAAGCCCTCGTGGACCCTCGCATCCACGTCAACGCCACGCCCGCATCGT  
 GGGTGGCGTTGAGGCCACGCCACACTCGTGGCCCCACCAGGCGGCTCTTTCATCGACGACATGTACTTC  
 TGCGGGCGTTCCTCATCTCCAGCGAGTGGGTCTCACGGCCGCCCACTGCATGGACGGCGCCGGCTTCG  
 TCGAAGTGGTACTGGGCGCCCAACATCCGCCAGAAGCCAGCCAGGTCTCCATTACCTCCACCGA  
 CTTCCTCACTCACGAGAACTGGAACTCTTGGTCTCTACCAACGACATTGCCCTCATCAGGTGCCCAGC  
 CCCGTTTCACTCAACTCAAACATCAAGACCGTCAAGCTGCCCTCCAGTGATGTGTCTGTGGGAACCACCG  
 TCACGCCACAGGTGGGGCCGCCCTTCCGACTCTGCCAGCGGTATCTCCGACGTCCTCCGTGAGGTGAA  
 CGTGCCCGTCATGACCAACGCTGACTGCGACTCCGTGTACGGCATCGTCGGCGACGGCGTCTGTCTGCATC  
 GACGGCACCGGCGGCAAGAGCACCTGCAACGGTACTCCGGCGGCCCTCAACCTCAACGGCATGACCT  
 ACGGCATCACCTCCTTCGGTTCCTCGGCCGGTGCAGAAAGGCTACCCCGCCGCTTACCCGCGTCTA

CTACTACCTGGACTGGATCCAGCAGAAGACCGGGCTCACTCCCTGAGCGGCCTCACTTCGGCAGGAACCT  
 TCAGGACTGCTAAACACAGCGGCAGTCCCTGGGTCTCCTGAATAACTTATGACTGCTTCCACTCTTAGA  
 AATAAATGAAAGAATTGGC

□ Catepsina

>X99730.1 *P.vannamei* mRNA for cathepsin L

AGAGCCCGCCGAGATGAAGTTCCCTGACAGTGTGGCTTGCCTCGTGGCCGCCGCCGTGGCCAGCCCCCTCC  
 CTCCGCCAGCAATGGCGTGACTTCAAGGCTGAGCACGGCCGCCGTACGCCAGCGTGCCAGGAGGAGCGCT  
 ACCGCCTGTCGGTGTTCGAGCAGAACCAGCAGTTCATCGACGACCACAACGCCAGGTTTCGAGAACGGCGA  
 GGTCACGTTACGCTCCAGATGAACCAGTTCGGCGACATGACCTCCGAGGAGTTCACCGCCACCATGAAT  
 GGCTTCCTCAACGTTCCCAGCCGTCGGCCGACTGCGATCCTGAGAGCCGACCCCGACGAGACTCTCCCGA  
 AGGAGGTGGACTGGCGCACCAAGGGCGCCGTGACGCCCCTCAAGGACCAGAAGCAGTGCGGGTCCCTGCTG  
 GGCTTCTCCACGACCGGCTCCCTGGAGGGCCAGCACTTCCCTGAAGGACGGCAAGCTGGTGAGCCTCTCA  
 GAGCAGAACCCTCGTCTGACTGCTCCGACAAGTTCGGCAACATGGGCTGCATGGGCGGCCCTCATGGACCAGG  
 CCTTCCGCTACATCAAGGCCAACAAGGGCATCGACACCGAGGACTCCTACCCGTACGAGGCTCAGGACGG  
 TAAGTGTGCTTCGACGCCCTCCAACGTCGGCGCCACCGACACCGGCTACGTAGACGTCGAGCACGGCAGC  
 GAGAGCGCCCTCAAGAAGGCCGTGGCCACCATCGGCCCCATCTCCGTGGCCATCGACGCCCTCCAGCCGT  
 CCTTCCAGTTCTACCATGACGGCGTGTACTACGAGGAGGGCTGCTCGTCCACGATGCTGGACCACGGCGT  
 CCTGGCGGTGGGCTACGGCGAGACGGAGAAGGGCGAGGCTACTGGCTGGTCAAGAACTCGTGGAACACC  
 TCCTGGGGCAACAAGGGCTACATCCAGATGTCGCGCACAAGAAAAACAACCTGCGGCATCGCCAGCCAGG  
 CTTCCTACCCGCTGGTCTAGCGAGTCCGGTCCGCCGTGCTGCGTCGCCAAAGATACCCGTTGCTGCGG  
 TCTAACTGTCAACAAAGAATTGGTTTTAAAGACCATTAGCATGAAGGTTTTGTTTTATTTTCATCTGGAAT  
 ATCTAATGTTACACGAACTTATATCACTCGTGGAAATAAGATAATCACACGA