CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE HARINA DE LANGOSTILLA (*Pleuroncodes planipes*) EN EL ALIMENTO SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA EN EL INTESTINO DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*).

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuacultura)

P r e s e n t a

Elia Gladys Ayala Borboa

La Paz, Baja California Sur, Mayo del 2014

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15 horas del día 10 del Mes de Abril del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE HARINA DE LANGOSTILLA (*Pleuroncodes planipes*) EN EL ALIMENTO SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA EN EL INTESTINO DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)".

Presentada por la alumna:

Elia Gladys Ayala Borboa

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Dr. Dariel Tovar Ramírez
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Maurilia Rojas Contreras
CO-TUTOR

Dr. Roberto Civera Cerecedo
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Director de tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S. México.

Co-tutores

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B. C. S., México.

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S. México.

COMITÉ REVISOR

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Dr. Roberto Civera Cerecedo

MIEMBROS DEL JURADO DE LA DEFENSA DE TESIS

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Dr. Roberto Civera Cerecedo

Dr. Héctor Nolasco Soria (Suplente)

RESUMEN

La acuicultura es el sector de mayor consumo de harina de pescado, sin embargo este ingrediente es caro y no está siempre disponible, lo cual hace necesaria la exploración de nuevas fuentes de proteína accesibles y de buena calidad. La langostilla roja *Pleuroncodes planipes* es un recurso natural con un potencial para ser utilizado como fuente de proteína ya que a ciertos niveles de inclusión en el alimento, acelera el crecimiento, aumenta la actividad proteolítica del hepatopáncreas y la digestibilidad. El camarón blanco es el principal crustáceo cultivable en México, y aún requiere de estudios para abatir problemas relacionados a enfermedades, conocer más a fondo su fisiología y bioquímica digestiva a nivel molecular. Se han realizado muchos estudios dirigidos a conocer las funciones digestivas catabólicas del camarón, basadas principalmente en la glándula digestiva, sin embargo, se conoce poco sobre el papel de las enzimas digestivas intestinales. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado con harina de langostilla roja sobre la actividad y expresión de los genes que codifican para las principales enzimas digestivas en el intestino de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Para ello, se realizó un bioensayo de crecimiento con camarones (peso promedio 0.25 g) que fueron alimentados durante 31 días con dos alimentos: un alimento control conteniendo harina de pescado (HP) y un alimento con harina de langostilla a manera de sustituir la proteína de la HP. Al final del experimento, los organismos en estadio de intermuda fueron pesados y sacrificados para disectar sus intestinos y realizar análisis de expresión génica por medio de microarreglos heterólogos, los genes sobre-expresados y reprimidos se obtuvieron por medio de un umbral establecido en 2 (Z score) en el software Genarise y se analizaron en el Servidor DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) para investigar la funcionalidad de los genes sub y sobrexpresados en GO (Gene Ontology). La expresión relativa de los genes seleccionados fue determinada mediante qPCR utilizando primers específicos según el método de ΔΔCq mediante el sistema CFX96. La inclusión de harina de langostilla en el alimento produjo un mayor crecimiento y un aumento en la actividad proteolítica de tipo tripsina y aminopeptidasa. El análisis de microarreglo generado reveló 416 genes sobre-expresados en el tratamiento con harina de langostilla. Nuestros resultados muestran que la expresión es más alta en los camarones alimentados con harina de langostilla en tripsina y aminopeptidasa. Los patrones obtenidos de las proteasas digestivas podrían resultar en una mayor digestibilidad de proteína y eventualmente repercutir en el mejor crecimiento obtenido de los camarones alimentados con langostilla. Este trabajo es el primer estudio que demuestra la existencia de genes codificantes de las principales enzimas digestivas en el intestino del camarón *L. vannamei*. Los resultados muestran que la langostilla roja puede ser considerada como una fuente de proteína de alta calidad y un buen sustituto parcial de la harina de pescado o formar parte de los ingredientes de las dietas comerciales, puesto que promueve el crecimiento del camarón mediante el mejor aprovechamiento de los nutrientes de la dieta y mejora la capacidad enzimática digestiva.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, enzimas digestivas, expresión génica.

ABSTRACT

Aquaculture is the sector with main consumption of fish meal, however this ingredient is expensive and is not always available, making it necessary to the exploration of new sources of protein are accessible and good quality. In Mexico, the Red Crab (*Pleuroncodes planipes*) is a natural resource with great potential to be used as a source of protein, allowing certain levels of inclusion in food accelerate growth, increase the proteolytic activity of the digestive gland and digestibility. The white shrimp is the main arable crustacean in Mexico, and still require studies to reduce problems related to diseases, learn more about their physiology and digestive Biochemistry at the molecular level. There have been many studies aimed to know digestive functions catabolic shrimp, based mainly on the digestive gland, however, little is known about the role of intestinal digestive enzymes. The objective of this study was to evaluate the effect of partial replacement of fish meal with red crab meal on activity and expression of the genes that code for the main digestive enzymes in the intestine of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. It conducted a bioassay of growth with shrimp (weight average 0.25 g) that were fed during 31 days with two foods: a food control containing fishmeal (HP) and a food containing red crab meal a way to replace the HP protein. At the end of the experiment, agencies in intermolt Stadium were weighed and slaughtered to dissect their intestines and perform analysis of gene expression by microarrays heterologous, above-expressed and repressed genes were obtained through a threshold set at 2 (Z score) in the software Genarise and analyzed in the server DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) to investigate the functionality of genes under and overexpressed in GO (Gene Ontology). The relative expression of selected genes was determined using qPCR using specific primers using the method ΔΔCq through the CFX96 system. The inclusion of red crab in feed produced higher growth and an increase in the proteolytic activity of trypsin and aminopeptidase type. The analysis of microarray generated revealed 416 overexpressed genes in the treatment with red crab meal, of which 227 are included in gene ontology. Our results show that the expression is higher in fed with red crab meal in trypsin and aminopeptidase shrimp. The patterns obtained from digestive proteases could result from a higher digestibility of protein and eventually affect the best growth obtained from shrimp fed with red crab meal. This work is the first study that shows the existence of genes coding for the major digestive enzymes in the intestine of shrimp *L. vannamei*. The results show that the Red crab can be considered as a source of high quality protein and a good partial substitute for fish meal or part of the ingredients of commercial diets, since it promotes the growth of shrimp through the better use of dietary nutrients and improves the digestive enzyme capacity.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, digestive enzymes, gene expression.

DEDICATORIA

A mi grande y hermosa familia.

.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de maestría otorgada con registro 416918.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y en especial a todo el personal de la Dirección de Estudios de Posgrado, dirigido por la Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Claudia Elizabeth Olachea, Beatriz Adriana y Lupita por su atenta ayuda en los trámites académicos, así como por atender mis solicitudes de apoyos complementarios para asistencia a congresos.

Agradezco ampliamente a mi tutor el Dr. Dariel Tovar Ramírez por aceptarme en su grupo de trabajo, por todo el apoyo, por su tiempo, aclarar dudas, exigencias, paciencia, revisiones y por brindarme siempre todas las oportunidades y recursos necesarios para mi formación y para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Roberto Civera Cerecedo y a la Dra. Maurilia Rojas Contreras por aceptar ser parte de este trabajo, por su apoyo, por su tiempo, sus valiosos comentarios, revisiones, correcciones, enseñanzas y sobre todo gracias por su paciencia.

Al Dr. Héctor Nolasco Soria por su contribución en el presente trabajo con sus valiosos comentarios y sugerencias.

Agradezco por el apoyo técnico y asistencia a los responsables de los diferentes laboratorios del CIBNOR donde se llevó a cabo este proyecto, al Biól. Mar. Hever Latisnere Barragán, que como responsable del Laboratorio Biotecnología de Organismos Marinos me permitió desarrollar gran parte del trabajo contenido en este documento. Al M.C Jesús Neftalí Gutiérrez Rivera y Griselda Francisca Gallegos (Laboratorio de Biología Molecular); al Dr. Ernesto Goytortúa Bores por sus valiosos tips y su ayuda en la elaboración de los alimentos experimentales, al Dr. Marco Cadena Roa por todas facilidades prestadas durante el experimento y en especial a la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar, (Laboratorio de Fisiología Comparada). Muchas gracias por las facilidades otorgadas y por sus valiosos consejos técnicos.

A los compañeros de Laboratorio: Carlos, Ana Ruth, Biviana, Paty, Carolina, Oney y Jimi. Quienes compartieron consejos, tips técnicos, aclararon dudas y de alguna manera amenizaron la estancia en el laboratorio

Agradezco a los responsables del Laboratorio de Cómputo Horacio Sandoval Gómez y José Manuel Melero Astorga por su eficiente apoyo.

Agradezco a Biviana Paz por su amistad, apoyo y sus valiosos tips.

Agradezco a mis compañeros de generación principalmente: Ely, Pilar, Biviana, Emanuel, Edgar, Iara, Laura, Fermín, Martín y Oscar, por su amistad, por su buen humor y por todos los buenos momentos que hicieron más amena mi estancia.

De manera especial agradezco a Estefanía Angulo (y familia), compañera incondicional que gracias a su gran apoyo, sus consejos, su cariño, su alegría, su compañía y su confianza fue menos doloroso estar lejos de mi familia. ¡Muchas Gracias por estar conmigo en todo momento!

Y por supuesto agradezco infinitamente a mi familia, por su apoyo, su cariño y su ánimo siempre ofrecido. Gracias son lo más valioso y lo más importante que tengo en mi vida.

GLOSARIO

ADN (ácido desoxirribonucleico): molécula de doble cadena de polinucleótidos que se mantienen unidos en su configuración helicoidal mediante puentes de hidrógeno entre cadenas opuestas.

cDNA: es el ADN complementario que se obtiene *in vitro* mediante la enzima transcriptasa inversa que utiliza como templado ARNm maduro.

Amplicón: conjunto de moléculas de ADN idénticas, resultado de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

ARN (ácido ribonucleico): polímero mono catenario compuesto por una larga secuencia de nucleótidos unidos covalentemente. Se distinguen tres clases de moléculas de ARN: ARN mensajero, ARN de transferencia y ARN ribosomal.

ARNm: molecular de ARN mensajero que se transcribe del ADN genómico nuclear y se traduce desde el extremo 5' al extremo 3' en una cadena polipeptídica.

Ciclo cuantitativo (Cq): el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia alcance el umbral (threshold).

Curva de disociación: puede indicar la temperatura de desnaturalización (Tm) de un amplicón o la presencia de amplicones no específicos.

Curva estándar relativa: ayuda en el cálculo de la eficiencia de la PCR y como control positivo al definir el rango dinámico y el límite de detección.

DNasa (deoxirribonucleasa): clase de enzima que rompe los enlaces fosfodiésteres del ADN originando fragmentos oligonucleotídicos.

dNTP: deoxinucleósido trifosfato. Se distinguen dATP, dCTP, dTTP y dGTP. Son los precursores utilizados en reacciones de polimerización de ADN.

Expresión génica: se refiere a los procesos de replicación de ADN, transcripción y traducción.

Gen: unidad física y funcional que ocupa una posición especifica en el genoma.

Genes de referencia: se utilizan como control interno en un ensayo. Este corrige la variación de muestra a muestra en la eficiencia de la RT-PCR y errores en la cuantificación de la muestra.

PCR (siglas en ingles de Polymerase Chain Reaction): es un método utilizado para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de ADN o cDNA a partir de cadenas pequeñas de muestra.

qPCR: tecnica que permite la medicion cuantitativa de un gen especifico en una muestra de acidos nucleicos.

RNAsa: Enzima (nucleasa) distribuidas en todos los tejidos capaz de catalizar la hidrolisis de ARN; se dividen en endonucleasas y exonucleasas.

Transcripción: síntesis enzimática de ARN utilizando un templado de ADN catalizada por la ARN polimerasa con el auxilio de proteínas especificas (factores de transcripción).

Transcrito: es el producto de ARN que se obtiene inmediatamente después de la trascripción.

Mezcla equimolar: mezcla de dos o más substancias que se encuentran presentes en la misma cantidad de moles.

Microbiota: es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera normal en distintos sitios del cuerpo de los organismos.

Isoforma: es cualquiera de varias formas diferentes de la misma proteína. Las diferentes formas de una proteína pueden ser producidas a partir de genes relacionados, o pueden surgir del mismo gen mediante corte y empalme alternativo.

CONTENIDO

RESUMEN i
ABSTRACT ii
DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTOS iv
GLOSARIO vi
CONTENIDO viii
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE TABLAS xi

1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 3
   2.1. Camarones como organismos de cultivo. 3
   2.2. Características Generales de *Litopenaeus vannamei*. 3
   2.3. Sistema digestivo de crustáceos. 4
   2.4. El alimento en la industria acuícola. 5
   2.5. Ingredientes alternativos. 5
   2.6. Generalidades de la langostilla roja. 6
   2.7. La langostilla como ingrediente en la acuacultura. 7
   2.8. Digestibilidad de nutrientes. 8
   2.9. Enzimas digestivas. 8
   2.10. Nutrigenómica. 10
   2.11. Microarreglos. 11
      2.11.1. Microarreglos heterólogos. 12
   2.12. Expresión génica. 12
3. JUSTIFICACIÓN 15
4. HIPÓTESIS 17
5. OBJETIVOS 18
   5.1. General. 18
   5.2. Específicos. 18
6. MATERIALES Y MÉTODOS 19
   6.1. Alimentos experimentales. 19
   6.2. Organismos experimentales. 21
   6.3. Diseño experimental y sistema de cultivo. 21
   6.4. Extracción de ARN total (TRIZOL™ Invitrogen). 23
   6.5. Síntesis de cDNA (RT-PCR). 24
   6.6. Hibridación de un microarreglo heterólogo. 24
   6.7. Validación del microarreglo por PCR en tiempo real (qPCR). 25
   6.8. Proteína soluble. 26
   6.9. Análisis de actividad enzimática. 26
      6.9.1. Actividad amilasa. 27
      6.9.2. Actividad aminopeptidasa N. 27
      6.9.3. Actividad quimotripsina. 28
      6.9.4. Actividad tripsina. 28

6.10. Análisis estadísticos. 28
7. RESULTADOS 29
7.1. Bioensayo de crecimiento. 29
7.2. Extracción de ARN total. 31
7.3. Análisis de microarreglo heterólogo. 32
7.4. Validación del microarreglo. 35
7.5. Actividad enzimática. 38
8. DISCUSIÓN 40
8.1. Bioensayo de crecimiento. 40
8.2. Análisis de la expresión masiva de genes. 44
8.3. Efecto del alimento en la expresión diferencial de genes. 46
8.4. Actividad enzimática digestiva. 47
9. CONCLUSIÓN 52
10. RECOMENDACIONES 53
11. LITERATURA CITADA 54
ANEXOS 68
ANEXO 1 68
11.1 Extracción de ARN total 68
ANEXO 2 70
11.2 Hibridación de microarreglo heterólogo 70
ANEXO 3 71
Lista de genes sobre-expresados y reprimidos 71
ANEXO 4 72
11.4 Gráficos obtenidos en el análisis de qPCR. 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Tanques de fibra de vidrio del sistema de cultivo utilizado en el experimento. 22
Figura 2. Sistema digestivo de *Litopenaeus vannamei*.....23
Figura 3. Supervivencia final (media ± D.E.) de juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 31 días con el alimento Control (HP) y el alimento con harina de langostilla (HL). Letras iguales sobre las barras indican la ausencia de diferencias significativas (P≥0.05). .29
Figura 4. Ganancia en peso final (media ± D.E.) de juveniles de L. vannamei alimentados durante 31 días con el alimento Control (HP) y el alimento con harina de langostilla (HL). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. (P≤0.05). 30
Figura 5. Factor de conversión alimenticia al final (media ± D.E.) de juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 31 días con el alimento Control (HP) y el alimento con harina de langostilla (HL). Letras diferentes sobre las barras indican la diferencias significativas (P≥0.05). 31
Figura 6. Extracción del ARN total con el método TRIZOL. Se obtuvieron 3 fases; se recuperó la superior acuosa incolora (ARN), que representa el 60% del volumen de Trizol utilizado para la homogenización. Las fases restantes corresponden a restos celulares como proteína (intermedia) y al ADN (fase rojiza). 31
Figura 7. Fotografías de laminillas tipo microarreglo a) correspondientes a intestinos de camarones alimentados con el alimento control (HP) y b) de intestinos de camarones alimentados con el alimento experimental (HL).....32
Figura 8. Genes sobre-expresados por arriba del umbral de 2 (Z score) y genes reprimidos por abajo del inverso de 2, obtenidos con la ayuda del software GeneArise. 32
Figura 9. Valores de estabilidad para los genes de referencia obtenidos por geNorm. 36
Figura 10. Valores de estabilidad para los genes de referencia obtenidos por NormFinder.36
Figura 11. Nivel de expresión de amilasa (AMY), quimotripsina (CHY), tripsina (TRY) y aminopeptidasa (AMP) relativo a gen factor de elongación 1 (EF1α) en juveniles de camarones alimentados con harina de langostilla (HL) y harina de pescado (HP). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (P≥0.05). 38
Figura 12. Actividad enzimática digestiva en el intestino de camarones *L. vannamei* alimentados con dos tipos de alimentos: harina de langostilla (HL) y harina de pescado (HP).Se muestran las medias ±D.E. Letras iguales sobre las barras indican la ausencia de diferencias significativas (P≤0.05). 39
Figura 13. Diagrama de Venn que muestra la relación entre los genes sobre-expresados en el intestino (INT) y el hepatopáncreas (HEP) de organismos alimentados con harina de langostilla (HL). 45
Figura 14. Diagrama de Venn que muestra la relación entre los genes reprimidos en el intestino (INT) y el hepatopáncreas (HEP) de organismos alimentados con harina de langostilla (HL). 45
Figura 15. Actividad específica (U/mg) de diferentes enzimas digestivas en intestino y hepatopáncreas; a) tejido de camarones alimentados con harina de langostilla y b) tejido de camarones alimentados con harina de pescado.....49
Figura 16. Actividad específica de las cuatro enzimas analizadas en camarones alimentados con harina de langostilla (HL) y harina de pescado (HP) en hepatopáncreas e intestino.....50

LISTA DE TABLAS

Tabla I.Composición en ingredientes de los alimentos experimentales. 20
Tabla II. Composición química proximal y de energía de los ingredientes utilizados en la fabricación de los alimentos experimentales del experimento. 21
Tabla III. Composición química proximal de los alimentos experimentales. 21
Tabla IV. Marcaje de ARN de los tratamientos.....25
Tabla V. Mezcla para una reacción de RT-PCR empleando SYBR Green.....26
Tabla VI. Parámetros del ciclo térmico que se utilizó para la amplificación de las secuencias. 26
Tabla VII. Resultados zootécnicos y utilización del alimento durante el bioensayo de crecimiento con juveniles de *L. vannamei*.....29
Tabla VIII. Anotación funcional (DAVID) de genes sobre-expresados en el microarreglo heterólogo (*D. melanogaster*) de genes en el intestino camarones alimentados con harina de langostilla.....33
Tabla IX. Anotación funcional (DAVID) de genes reprimidos en el microarreglo heterólogo (*D. melanogaster*) de genes en el intestino camarones alimentados con harina de langostilla.....34
Tabla X. Procesos biológicos mayormente representados entre la expresión diferencial de genes sobre expresados presentes en el intestino de camarón, basado en el análisis DAVID. 34
Tabla XI. Procesos biológicos mayormente representados entre la expresión diferencial de genes sobre reprimidos presentes en el intestino de camarón, basado en el análisis DAVID. 35
Tabla XII. Secuencia de los primers utilizados para la detección expresión de amilasa (AMY), aminopeptidasa(AMP), quimotripsina (CHY), lipasa (LIP), tripsina (TRY), factor de elongación 1 (EF1) y β-Actina(β-Actin).....37
Tabla XIII. Contenido de aminoácidos (% en base seca) en los macroingredientes utilizados en los alimentos. 43

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento tan acelerado de la población mundial ha propiciado que la explotación de muchas especies marinas haya alcanzado su rendimiento máximo sostenible. Por eso el hombre ha recurrido al cultivo artificial de algunas de ellas, como forma de preservar las poblaciones naturales y lograr el incremento en la producción de alimentos que se requiere (Rosenberry, 2004).

Debido a esto la producción acuícola mundial ha aumentado rápidamente en los últimos años, representando actualmente el 32% de la producción pesquera total. Los crustáceos, y en particular los camarones peneidos, ocupan un lugar destacado en la acuacultura a escala mundial debido a los buenos precios que mantienen en el mercado internacional. México es la sexta potencia mundial en producción de camarón. El crustáceo se ubica en primer lugar como generador de divisas entre los productos pesqueros y ocupa el tercer sitio por volumen, representando el mayor valor económico del subsector con casi la mitad de los ingresos por este concepto (CONAPESCA, 2010). El éxito del cultivo del camarón, como de cualquier otra especie, depende en gran medida de una adecuada nutrición y manejo de alimento. En cultivos semi-intensivos e intensivos, la biomasa de cultivo es grande, de manera que no es fácil alimentar a los camarones únicamente con el alimento vivo de la productividad natural, por lo que se complementa o sustituye con alimento balanceado. Por esta razón, el alimento artificial es un elemento de gran importancia dentro de los cultivos ya que de él depende la producción y rentabilidad de las empresas, en este caso de la industria camaronera (Díaz et al., 2004).

Por otro lado la tecnología enzimática, una rama de la biotecnología ha resultado de gran utilidad para la acuicultura (Díaz et al., 1995, García-Carreño et al., 1996, Ezquerra et al., 1996). La enzimología es importante porque la vida depende de una compleja red de reacciones químicas catalizadas por enzimas específicas. Los organismos en cultivo toman componentes de la dieta y los utilizan para formar las moléculas de construcción de su cuerpo. Otras son usadas como combustible para dar energía actividades como movimiento, reproducción, defensa contra parásitos y depredadores, etc. (catabolismo). La síntesis de

moléculas para la construcción del cuerpo del organismo (anabolismo) se realiza utilizando la energía derivada del catabolismo. Catabolismo y anabolismo forman el metabolismo. Este está dirigido y modulado por enzimas específicas para cada una de las reacciones químicas.

La base de la formulación de alimentos balanceados es la fuente de proteína. Los alimentos comerciales para camarón contienen entre 30 y 50% de proteína cruda.

Las fuentes alternas de proteína representan una oportunidad para aumentar la eficiencia en el uso de los recursos para alimentación y ofrecen interesantes posibilidades para incrementar la rentabilidad, dando también mayor flexibilidad al proceso de la formulación.

La Langostilla roja (*Pleuroncodes planipes),* crustáceo muy abundante en las costas de Baja California, tiene un gran potencial como fuente de proteína y aceite de alta calidad para el cultivo de salmónidos y de crustáceos (Van Olst et al., 1976). Debido a su gran actividad enzimática, la langostilla puede ser utilizada también como una fuente potencial de enzimas de interés para procesos biotecnológicos (García-Carreño, 1992).

En la presente investigación se evaluó a la langostilla roja (*P. planipes),* como sustituto parcial de la proteína presente en la harina de pescado en el alimento para juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, se determinó la tasa de crecimiento, sobrevivencia y factor de conversión alimenticia, así como la actividad enzimática y la expresión de genes codificantes para enzimas digestivas presentes en el intestino.

2. ANTECEDENTES

2.1. Camarones como organismos de cultivo.

Entre las características que favorecen el cultivo de los camarones peneidos se encuentran: ciclo de vida corto, alta fecundidad, baja tasa de mortalidad en el cultivo, crecimiento rápido, respuesta positiva a la suplementación alimenticia, resistencia a cambios ambientales y alto valor comercial.

Los crustáceos, como todas las especies de artrópodos, están sometidos cíclicamente a un periodo de muda durante el cual el organismo pierde el exoesqueleto. Durante este proceso, el organismo, además de requerir una considerable cantidad de energía, presenta periodos de alimentación y periodos de ayuno dependiendo del estadio en el que se encuentre. Debido a la pérdida del exoesqueleto que implica la muda, los organismos pierden la capacidad de manipular e ingerir el alimento por periodos de hasta 120 h (Cuzon et al., 1980; Barclay et al., 1983). La tendencia actual de sustituir a la harina de pescado como fuente de proteína convencional por otros ingredientes proteicos en el alimento de camarón blanco, ha sido posible gracias a que este organismo es un crustáceo omnívoro (Cuzon et al., 2004).

2.2. Características Generales de Litopenaeus vannamei.

Phylum: Arthropoda
Clase: Crustácea
Subclase: Malacotraca
Serie: Eumalacostraca
Superorden: Eucarida
Orden: Decápoda
Suborden: Eucarida
Infra orden: Penaeidea
Superfamilia: Penaeoidea
Familia: Penaeidae
Género: *Litopenaeus*
Especie: v*annamei* *(Pérez-Farfante y Kensley, 1997),*

El camarón blanco del pacifico (*Litopenaeus vannamei*) es nativo de la costa del océano Pacifico de América central y del sur desde México hasta Perú. Esta es la especie líder en los cultivos de camarón del hemisferio occidental representando más del 95% de la producción. Sus características productivas favorables han hecho que en la actualidad se está cultivando también en el área del océano Atlántico con excelentes resultados en países como Brasil, Colombia, Panamá y Venezuela entre otros.

Este camarón presenta resultados productivos y económicos superiores a los de *L. schmitti*, entre éstos están los mejores rendimientos, ritmo de crecimiento superior, menores requerimientos de proteína y alta supervivencia en la etapa larval. Por otra parte, presenta una tasa uniforme de crecimiento y puede alcanzar una talla máxima de 23 cm.

Otras características como la resistencia a los cambios bruscos de factores ambientales tales como niveles bajos de oxígeno y variaciones importantes de la salinidad sin afectaciones a la supervivencia hacen que esta especie presente ventajas en el cultivo con referencia al *L. schmitti*. También tolera más fácilmente las altas densidades de siembra y es menos exigente en cuanto al pienso administrado al intensificarse su uso de los alimentos disponibles en el medio natural (Morales Díaz, 2004).

2.3. Sistema digestivo de crustáceos.

Los estudios sobre el sistema digestivo de los crustáceos se han multiplicado durante las últimas décadas en las especies de interés comercial, principalmente en los camarones peneidos. Sin embargo, la aplicación de este conocimiento para mejorar la producción no ha mantenido el mismo ritmo.

Las funciones del tracto digestivo de los crustáceos son ingestión, transporte de ingesta, digestión, absorción, almacenamiento de nutrientes y transporte de nutrimentos a los vasos circulatorios y finalmente eliminación de las excretas al medio. El tracto se subdivide clásicamente en cinco partes: boca, esófago, estómago, glándula digestiva (hepatopáncreas) e intestino (anterior, medio y posterior) (Ceccaldi, 1997).

2.4. El alimento en la industria acuícola.

La nutrición es uno de los factores más importantes para la acuacultura ya que conforme se intensifica el sistema de cultivo, va cobrando mayor relevancia la calidad y la cantidad del alimento suministrado.

La nutrición abarca los procesos químicos y fisiológicos por medio de los cuales un animal se provee de nutrientes para su metabolismo basal, mantenimiento, crecimiento y reproducción. Por lo tanto involucra la ingestión, la digestión, la absorción y el transporte de nutrientes, así como la remoción de productos de desecho (Akiyama y Dominy, 1989).

La alimentación constituye uno de los costos más altos en la producción acuícola de crustáceos (Villarreal, 1995; Jory, 2001), puede llegar a representar hasta 2/3 partes de los costos de operación de la producción de las granjas, por lo que un óptimo aprovechamiento de este factor permitirá elevar la eficiencia de la producción.

Por ello, la tendencia actual de la investigación en nutrición acuícola se concentra en la reducción del costo de alimentación, en donde la proteína es el componente más caro en el alimento ya que es esencial para el crecimiento de las especies en cultivo.

Es así que una línea de investigación en la acuicultura se ha venido centrando en el estudio de factores que permitan la formulación y elaboración de alimentos que optimicen la productividad, minimicen la pérdida de nutrientes en las heces y que puedan significar un ahorro en los costos de producción (Civera et al., 1998; Divakaran y Velasco, 1999).

2.5. Ingredientes alternativos.

Entre los ingredientes más comúnmente usados en la elaboración de dietas balanceadas para camarón se encuentran las harinas de pescado, soya, trigo, maíz, sorgo, calamar, cabeza de camarón y diversas levaduras (New, 1987). En la actualidad existe un decremento en el suministro y un incremento en el costo de las proteínas de origen animal y vegetal. Un ejemplo de lo anterior son las harinas de pescado (fuentes de proteína que generalmente se utilizan en un mayor porcentaje en las dietas para organismos acuáticos), en donde la captura mundial de pescado para la producción de harinas está cercana al máximo rendimiento que es posible sostener sin reducir significativamente las poblaciones de peces, y sin embargo, la demanda de dichos productos sobrepasa ampliamente la oferta.

En general, los alimentos disponibles comercialmente para la acuicultura contienen fuentes de proteína y lípidos de origen animal y vegetal, así como de carbohidratos, a los que se les suplementa con vitaminas, minerales, conservadores, atrayentes y colorantes. Sin embargo, el incremento en precio de los alimentos exige la selección y evaluación de ingredientes para establecer características deseables al producto, tales como calidad nutricional, buena estabilidad en el agua, atrayentes y palatables, que permitan tallas de buen valor comercial y mayores rendimientos, para hacer más rentable la actividad del cultivo.

Diversos trabajos reportan el potencial de ingredientes alternativos, de origen vegetal y animal, que pueden sustituir parcialmente la harina de pescado, en cuanto a su composición de aminoácidos esenciales, palatabilidad y digestibilidad y que son menos costosos (Berger, 2001; Swick, 2002).

2.6. Generalidades de la langostilla roja.

La langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) es un crustáceo decápodo bentónico de la familia Galatheide, el cual habita en la costa Oeste de Norteamérica y la plataforma continental de las costas de Baja California (Vega-Villasante, 2002).Cálculos conservadores estiman una abundancia de 205,000 toneladas métricas (Ehrarhdt y Ramírez, 1982), pero estudios realizados más recientemente en el CIBNOR permiten suponer que pueden existir hasta 735,929 Tm./año, por lo que es un recurso muy abundante en esta zona, pero poco explotado comercialmente (Aurioles-Gamboa et al., 1995).

La composición química de la langostilla indica que los componente más abundante presentes en este organismo son: Proteína cruda (21.2-54.75%), ceniza (12.8-35.9%), quitina (4.76-21.6%) y extracto etéreo (4.7-14.0%). Esta variabilidad en su composición se debe a la zona en la que fue colectada, edad, temporada y profundidad de captura (Castro-González, et al., 1995).

2.7. La langostilla como ingrediente en la acuacultura.

La langostilla roja, por su abundancia, factibilidad de captura y composición química, se ha utilizado en la acuacultura como fuente de pigmentos o proteína con buenos resultados.

Investigaciones realizadas en el CIBNOR han demostrado que la langostilla en forma de harina puede ser incluida con éxito en alimentos experimentales para camarón (Goytortúa-Borés, 2000; Galicia., 2001; Vega-Villasante., 2003; Civera et al., 1998; Gutiérrez-Leyva R., 2003). Dichos trabajos reportan que la langostilla no solamente es un ingrediente con posibilidad de sustituir a las harinas de pescado, cabeza de camarón o soya, sino que además, a ciertos niveles de inclusión, promueve el crecimiento de los organismos, aumenta la actividad proteolítica en la glándula digestiva y mejora la digestibilidad de la proteína.

En el 2002 Vega-Villasante y colaboradores, realizaron un perfil bioquímico de la composición de un extracto soluble de langostilla liofilizado, el cual se consideró un aditivo potencial en los alimentos para camarón. En ese mismo estudio encontraron que el extracto crudo de langostilla posee capacidad antioxidante en la lipoperoxidación de tejido cerebral de rata y de los iones superóxido producido por la reacción de la xantina-oxidasa. También encontraron actividad de péptidos tipo insulina.

Van Olst et al (1976) usaron la harina de langostilla como alimento único y como complemento de una dieta comercial en ensayos de crecimiento con juveniles de la langosta (*Homarus americanus*) obteniendo resultados muy positivos.

En el 2004 Vega-Villasante y colaboradores, utilizaron un extracto total de langostilla liofilizado (ETL) a diferente niveles de inclusión (1, 2, y 3%) como aditivo en alimentos experimentales para juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, en este estudio encontraron que los organismos alimentados con estos alimentos incrementaron su consumo de alimento, crecimiento y supervivencia, con respecto a aquellos alimentados con el alimento control (sin extracto de langostilla).

2.8. Digestibilidad de nutrientes.

El valor nutricional de un alimento no depende solo de su contenido de nutrientes, sino también de la capacidad del animal para digerirlos y absorberlos. En la acuicultura, los estudios de digestibilidad tienen un triple objetivo: mejor conocimiento de la utilización potencial de los nutrientes, optimización de la calidad de los alimentos para los organismos, y finalmente, disminución de los desechos de origen alimentario; de modo que se pueda preservar la sanidad del ambiente en general y del agua en particular.

La digestibilidad de los nutrientes depende por una parte, de la calidad de la materia prima, el proceso, la forma y el tiempo de almacenamiento, y por otra parte, de la capacidad enzimática del organismo y de la eficiencia de su funcionamiento. Eficiencia que su vez, depende de la edad, del estado de salud del camarón, de las condiciones ambientales (Cruz-Suarez et al., 1999) y del ciclo de muda el cual afecta la actividad alimentaria (Vijayan et al., 1997) ya que pueden demorarse de 1-3 días en volver a comer, los camarones peneidos alcanzan su mayor actividad alimenticia en estadio de intermuda (Fernández et al., 1997).

2.9. Enzimas digestivas.

Las enzimas, como catalizadores de naturaleza proteica, son producidas en todos los sistemas biológicos haciendo posible un gran número de reacciones químicas específicas, siendo las responsables de la regulación de todas las actividades sintéticas y metabólicas de la célula (Rodríguez, 1999). Cada enzima es específica para un determinado sustrato debido a la capacidad que tiene de reconocer cierto tipo de enlaces.

Los primeros estudios de enzimas digestivas se realizaron a comienzos del siglo XX con la descripción de las enzimas secretadas por el páncreas en vertebrados y por la glándula digestiva (hepatopáncreas) de insectos y crustáceos, como las responsables de la hidrólisis de nutrientes poliméricos en el alimento (Gibson y Barker, 1979).

Las enzimas, al ser las únicas moléculas con capacidad de biotransformación, resultan herramientas de gran interés en áreas biológicas de relevancia como la biotecnología. Los catalizadores biológicos, como las enzimas, suelen ser atractivos para procesos industriales dada su alta especificidad para transformar un substrato, la eficiencia catalítica, el incremento de la tasa de reacción y la especificidad que presentan por la

reacción (García-Carreño y Navarrete del Toro, 1997). En ciencia y tecnología de alimentos, las enzimas han sido importantes en diferentes formas: (1) en la producción, procesamiento (biotransformación) y almacenamiento de materia prima, (2) en nutrición, durante los procesos de ingestión, digestión y asimilación del alimento y (3) como herramientas analíticas (Reed, 1993; Díaz López y García Carreño, 2000).

El conjunto de las enzimas proteolíticas está constituido de dos grupos: endopeptidasas, que cortan los enlaces peptídicos en el interior de las cadenas proteicas y las exopeptidasas, que cortan los enlaces peptídicos aminoterminales, carboxiterminales y los dipéptidos. En los crustáceos la digestión química de proteínas comienza en la cavidad cardiaca del estómago y continua en los túbulos del hepatopáncreas. El modelo de degradación de proteínas es en grandes líneas, similar al de los vertebrados: ruptura de las proteínas ingeridas por las endopeptidasas, degradación de los peptidos por las exopeptidasas y absorción a nivel de células especializadas del hepatopáncreas. Sin embargo, hay diferencias importantes que modifican ese modelo general como son: ausencia de acidificación del medio estomacal durante la digestión, poca actividad quimiotripsica, ausencia de elastasa y existencia de una colagenasa digestiva y de una proteasa de bajo peso molecular.

En los camarones peneidos se han encontrado actividades análogas a la tripsina, carboxipeptidasas A y B (Gates y Travis, 1969, 1973; Galgani, 1985). Aminopeptidasas y dipeptidasas (DeVillez, 1965; De Villez y Buschlen, 1967; Lee, 1980; Muramatsu y Morita, 1981).

La tripsina representa por sí sola el 60% de la actividad proteásica del hepatopáncreas en los crustáceos peneidos. La importancia relativa de esta enzima y su especificidad hacia los aminoácidos básicos que son esenciales en la nutrición de crustáceos, hace resaltar el problema de la calidad de las proteínas que se utilicen en su alimentación, en este caso un alimento balanceado. Estas proteínas deben contener los aminoácidos esenciales en cantidad óptima, pero también los aminoácidos que permitan una hidrólisis rápida de las proteínas.

Hay evidencias de una actividad quimiotripsica en varias especies de crustáceos, pero es generalmente débil (Brun y Wojtowicz, 1976; Trellu y Ceccaldi, 1977). En

Palemon serratus la quimiotripsina tiene una actividad media y aparece desde la embriogénesis.

La digestión de los lípidos está asegurada por las lipasas y esterasas. Los lípidos alimenticios deben sufrir dos tipos de transformaciones para poder ser absorbidos: -una emulsificación, que conduce a una micro-emulsión y una hidrólisis. Las lipasas actúan sobre los lípidos emulsionados y las esterasas continúan la digestión enzimática sobre los productos hidrosolubles obtenidos.

En los crustáceos los compuestos emulsificantes que desempeñan el mismo papel que la bilis de los mamíferos, es decir, la de dispersar las grasas antes de su digestión, son derivados de la taurina y de los ácidos cólico y desoxicólico.

2.10. Nutrigenómica.

Mientras que las investigaciones tradicionales sobre nutrición se enfocaban en la deficiencia de nutrientes y en el deterioro de la salud, en la actualidad estos estudios se orientan en la mejora de la salud a través de la dieta (Mclean y Graig, 2007). Durante las últimas décadas, estudios clínicos y epidemiológicos, han indicado muchas relaciones entre nutrición y salud. La desequilibrada ingesta de nutrientes es conocida por estar asociada con el desarrollo de enfermedades crónicas que demuestran que los componentes químicos del alimento tienen efectos directos sobre procesos genéticos moleculares (Lau et al., 2008). Los genes se activan y desactivan de acuerdo a las señales metabólicas que el núcleo celular recibe de factores internos, por ejemplo las hormonas, y factores externos como nutrientes, los cuales se encuentran entre los más influyentes de los estímulos ambientales (Harland, 2005).

La naturaleza química de los alimentos puede afectar la expresión de genes directa o indirectamente. A nivel celular, los nutrientes pueden: 1) actuar directamente como ligandos para los receptores de factores de transcripción, 2) ser metabolizados por las vías de intermediarios involucrados en la regulación génica o la señalización celular, o 3) alterar las vías de transducción de señales y la señalización (Kaput et al., 2004).

La secuenciación del genoma humano y de otros organismos ha permitido el desarrollo de toda una serie de metodologías científicas. Estas nuevas áreas de estudio

científico generalmente incluyen el sufijo “ómicas”. De lós 50 o más términos “ómicas” acuñados, la nutrigenómica abarca solo cuatro, nombrados como: transcriptómica o tecnología de microarreglos, el cual supervisa la alteración de los niveles de ARNm presentes en la célula, tejido u órgano (Scheel et al., 2002), proteómica, abarca la determinación de la estructura proteica, la expresión e interacciones moleculares (Kussman et al., 2005), metabolómica, examina los cambios en los metabolitos (intermediarios de bajo peso molecular) involucrados en el metabolismo (German et al., 2003) y epigenómica, que determina los patrones de metilación, impresión y empaquetamiento del ADN tanto espacial como temporalmente (Beck et al., 1999).

Esta información ha disparado un rápido avance en la industria alimenticia acuícola, que comienza a utilizar las herramientas técnicas comprendidas dentro de la nutrigenómica para entender cómo diferentes componentes de la dieta influencian los mecanismos moleculares los cuales a su vez, determinan la fisiología de los camarones (Paoloni-Giacobino et al., 2003).

2.11. Microarreglos.

No hace muchos años, la mayoría de los investigadores interesados en observar cambios en los niveles de expresión de los genes, tenían que estudiarlos uno por uno. Actualmente con la tecnología de los microarreglos diseñada por Brown P.O. y Botstein D. en 1999, es posible “hacer preguntas” a todos los genes de un organismo determinado, en un solo experimento.

El método de la expresión génica de *microarrays* de ADN permite realizar un análisis global de la transcripción del genoma completo o la mayor cantidad de genes anotados para determinada especie (Stingley, 2000).

El análisis de microarreglos es una de las tecnologías más poderosas y más usadas para analizar una gran cantidad de genes en las ciencias genómicas. La aparición de la tecnología de los microarreglos de cDNA y oligonucleótidos ha llevado a recapitular el paradigma en la investigación biológica, de tal manera que el cuello de botella en la investigación está cambiando de la generación de datos hacía el análisis masivo de datos (Sherlock, 2000). Su uso ha revolucionado la biología molecular impactando en áreas tales

como la académica, médica y farmacéutica, biotecnológica, agroquímica y la industria alimenticia (Plous, 2007).

2.11.1. Microarreglos heterólogos.

Los microarreglos se han convertido en una herramienta importante para entender el significado biológico de la regulación génica. Sin embargo, el desarrollo de un microarreglo específico puede ser lento y costoso.

Una estrategia alternativa para el desarrollo de un microarreglo propio de cada especie es utilizar un microarreglo desarrollado para una especie estrechamente relacionada. Experimentos de microarreglos que se realizan con una especie distinta para la cual fue diseñado originalmente se denominan microarreglos heterólogos o entre especies.

Estos microarreglos también son de especial interés en estudios de comparación evolutiva especialmente donde se comparan los perfiles de expresión de especies relacionadas, utilizando el mismo microarreglo. El error técnico debido a las diferencias en las características del microarreglo se controla y las dificultades asociadas con la comparación entre microarreglos se evitan. Por estas razones la aplicación de los microarreglos heterólogos ha ganado un gran interés en los últimos años (Bar-Or et al., 2007; Buckley, 2007).

2.12. Expresión génica.

Los cambios fisiológicos que presentan todos los seres vivos son generados por la expresión espacio-temporal de los genes de cada una de las estructuras del organismo (Zambonino y Cahu, 2001). Por ello, una manera de determinar la capacidad digestiva en larvas es conocer el momento en el que los organismos adquieren la maquinaria enzimática parecida a la de los adultos de su especie; esta determinación puede ser mediante la expresión de los genes de cada una de las enzimas digestivas, a través de retrotranscripción, acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés).

La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las

condiciones del experimento (gen de referencia). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de ARNm total de las muestras, ya que si la cantidad de control endógeno varía, es debido a cambios en la cantidad de ARN total empleada en la síntesis de cDNA, no a cambios en su expresión Los genes más utilizados como referencia son: la subunidad ribosomal 18S, GAPDH, ß-actina, TBP, HPRT, ß2microglobulina, factor de elongación 1-α, entre otros. No existe ningún gen cuya expresión no varía en ninguna de las condiciones (Livak et al., 1995).

La PCR en tiempo real puede generar amplicones muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de las alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de ARNm en muestras de tejidos con ARN parcialmente degradado (Bustin, 2002).

La primera documentación de la PCR en tiempo real se dio en 1993, y sin embargo, esta tecnología sólo recientemente alcanzó la la corriente principal. Actualmente es una técnica valiosa ampliamente aceptada (Ginzinger 2002). Una característica de la PCR en tiempo real es que se debe utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar ARN de una manera similar. Esto se puede solucionar mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa para generar cDNA a partir de una plantilla de ARN, lo que origina el proceso RT-qPCR (Valasek y Repa, 2005).

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción o RT (RT-PCR), puede cuantificarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una expresión relativa ya que se compara entre diferentes muestras (tejidos, tratamientos, time-points, etc.) la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (gen de referencia).

Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor

fluorescencia se emitirá. Los equipos de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos programados. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores (Bustin, 2002).

La utilización de sondas Taqman® que fluorescen a distintas longitudes de onda, facilita la amplificación de más de un gen en un mismo vial de PCR (ensayos multiplex), con lo cual la eficiencia y especificidad de amplificación entre ambos bancos es idéntica y perfectamente comparable, simplificando los ensayos de expresión de genes.

Es posible llevar a cabo ensayos de PCR en tiempo real sin emplear sondas Taqman®, para esto, es necesario emplear una molécula química de bajo peso molecular que emita la fluorescencia al encontrarse intercalado entre una cadena doble de ADN. Este tipo de moléculas están clasificadas en intercaladores (ej. Bromuro de Etidio) y enlazadores a la cadena menor del ADN (Minor Binding Groove, MGB). El reactivo SYBR® Green I es una MGB.

Es necesario que estos intercaladores cumplan con dos condiciones para poder ser utilizados en PCR en tiempo real. La primera, es que la fluorescencia detectada sea directamente proporcional a 1, número de copias obtenido en cada ciclo de la PCR y segundo, que esta molécula fluorescente no inhiba la PCR o disminuya la eficiencia de amplificación. Es importante mencionar que este tipo de amplificaciones debe cumplir con dos condiciones; al igual que con las sondas Taqman®, la eficiencia de amplificación deberá ser cercana al 100%. Para lograr esto, es necesario emplear primers con una temperatura de alineamiento cercanos a 60°C y tener productos de amplificación de menos de 150 pares de bases; y finalmente, se debe asegurar que los primers sean altamente específicos para el blanco de ADN, ya que el SYBR® Green I se puede enlazar a los productos de PCR inespecíficos provocando una desviación en la fluorescencia reportada y afectando la cuantificación final (Servin Vega, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Los crustáceos, y en particular los camarones peneidos, ocupan un lugar destacado en la acuicultura a escala mundial debido a los buenos precios que mantienen en el mercado internacional, lo que ha propiciado un ritmo de desarrollo acelerado. (Rosenberry, 2004).

El camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) es la especie más importante para el cultivo en nuestro país y en el mundo (Martínez Córdova, 1999; FAO, 2006), por lo que se considera preponderante trabajar con esta especie a fin de contribuir a su conocimiento y a que su cultivo sea cada vez más rentable.

Para que esto se mantenga, es necesario que los alimentos balanceados cubran los requerimientos nutricionales de los organismos. Dentro de los alimentos, el nutriente al que se le ha prestado mayor atención es la proteína, debido a su alto costo y al importante papel que juega en el crecimiento de los organismos. De aquí la necesidad de buscar fuentes alternas de proteína de alta calidad nutricional para la alimentación de los organismos acuáticos.

En México, uno de los recursos naturales con mayores probabilidades de utilizarse como ingrediente para alimentos balanceados es la langostilla (*Pleuroncodes planipes)*, es un crustáceo de la familia Galatheidae que en ocasiones llega a representar hasta el 70% de la fauna de acompañamiento en la pesquería de camarón en Baja California (Ehrarhdt y Ramírez, 1982). Por las características bioquímicas del extracto soluble de langostilla, y su capacidad como quimioatractante, fagoestimulante y promotor del crecimiento, puede ser utilizado como sustituto de la harina de pescado, soya o cabeza de camarón, así como aditivo funcional en alimentos balanceados para camarón.

Por otra parte, las funciones catabólicas digestivas de los camarones peneidos, parten en su mayoría del hepatopáncreas, debido a esto los estudios existentes acerca de enzimas en camarones han sido realizados en este órgano, siendo las más estudiadas la enzimas proteolíticas. Sin embargo, faltan más estudios para conocer el papel que juegan las enzimas digestivas dentro de los órganos restantes que comprenden el sistema digestivo del camarón, como lo es el intestino.

En la selección de un alimento que tenga efectos benéficos en el camarón, como es

un mayor crecimiento, es importante entender el efecto que tienen todos los componentes del alimento en la acción del sistema digestivo del organismo, así como establecer cuál es la mejor forma de medir esta acción. Una de esas posibles formas innovadoras, es utilizar genes expresados diferencialmente de acuerdo a diferentes tipos de alimentos. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se utilizó un microarreglo heterólogo para ser hibridado con muestras de intestino de camarones alimentados con dos fuentes proteicas diferentes, para la cuantificación de genes implicados en el proceso de digestión y crecimiento.

A diferencia de los trabajos anteriores, en el presente estudio se conocieron los efectos de la sustitución parcial de harina de pescado por harina de langostilla a nivel de expresión genética en el intestino, esperando contribuir al conocimiento de la fisiología digestiva de la especie.

4. HIPÓTESIS

Si la sustitución parcial de la harina de pescado por la harina de langostilla en el alimento acelera el crecimiento y aumenta la actividad enzimática digestiva en camarones peneidos, entonces estos cambios se reflejarán a nivel de la expresión de genes en el intestino de juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, que pueden ser identificados mediante el uso de microarreglos heterólogos y su validación por qPCR.

5. OBJETIVOS

5.1. General.

Evaluar el efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado con harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) en el alimento sobre la actividad y la expresión de genes codificantes para enzimas digestivas del intestino del camarón blanco *L. vannamei.*

5.2. Específicos.

- Evaluar el efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado con harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) en el alimento sobre la actividad y la expresión de genes codificantes para enzimas digestivas del intestino del camarón blanco *L. vannamei.*
- Analizar la expresión masiva de genes de juveniles de camarones alimentados con harina de pescado y harina de langostilla, mediante el uso de un microarreglo heterólogo (*Drosophila melanogaster*).
- Validar el microarreglo heterólogo mediante la selección y cuantificación de la expresión de genes seleccionados del microarreglo mediante qPCR utilizando β-actina y factor de elongación como genes de referencia.
- Evaluar la actividad de las principales enzimas digestivas presentes en el intestino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Alimentos experimentales.

La formulación de los alimentos se realizó en base a la composición proximal de los ingredientes utilizando el programa NUTRION (Guadalajara, Jalisco). Se diseñaron 2 alimentos isoproteicos, isolipídicos e isocalórico, un alimento control con 31% de inclusión de harina de pescado y un alimento con 18% de inclusión de harina de langostilla (Tabla I).

Los alimentos fueron fabricados en la planta de alimentos del CIBNOR siguiendo el método descrito en Civera y Guillaume (1989), en primer lugar se pulverizaron todos los ingredientes a un tamaño de partícula menor a 36 µm utilizando un molino ultra-centrífugo (16,000 rpm y criba de 0.08 mm; ReitschMR ZM 200). Los ingredientes sólidos fueron mezclados por 15 minutos en una mezcladora Kitchen AidMR de 2L, adicionando primero los macroingredientes secos (ingredientes incluidos en mayor porcentaje), seguidos de la mezcla de microingredientes, adicionando posteriormente una emulsión de aceites-lecitina. Una vez bien mezclados todos los ingredientes se agregó agua (alrededor del 40% en peso de mezcla sólida), y la pasta resultante fue pasada dos veces a través de un molino de carne para obtener pellets de 2mm de diámetro, mismos que fueron secados en una estufa con flujo de aire a 40°C por 18 horas. Los alimentos secos fueron pulverizados tamizados para obtener los diferentes rangos de tamaños de partícula. La tabla I muestra la composición de los alimentos experimentales en ingredientes.

MOLINO ULTRACENTRIFUGO ZM 200

Tabla I. Composición en ingredientes de los alimentos experimentales**.**

Ingredientes	Alimentos Experimentales	
	HP	HL
	Base húmeda	Base húmeda
Harina desechos atún	31.09	22.7
Harina Integral de Trigo	24.18	17.24
Pasta de Soya	25	25
Harina de Langostilla	0	18.58
Celulosa	10	5.99
Aceite de hígado de bacalao	2.43	3.2
Ácido algínico	2	2
Premezcla de vitamina de crustáceos	1.8	1.8
Lecitina de soya	1.5	1.5
Fosfato dibásico de sodio	1.2	1.2
Premezcla de mineral de crustáceos	0.5	0.5
Cloruro de colina	0.2	0.2
Vitamina C	0.09	0.09
Antioxidante BHT	0.004	0.004

Harina de desechos de atún: Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V. Guadalajara, México
Harina integral de trigo: Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V. Guadalajara, México.
Pasta de soya: Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V. Guadalajara, México.
Harina de langostilla: Elaborada en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR, S.C., utilizando juveniles enteros de *Pleuroncodes planipes*
Aceite de hígado de bacalao: Farmacia Paris S.A de C.V., México D.F.
Ácido algínico. Alginic acid, sodium salt. Aldrich 180947
Premezcla vitaminas (mg or IU / kg alimento): A acetato, 15000 IU; D3, 7,500 IU; E, 400; K3, 20; cloruro de colina (99%) 400 mg; tiamina HCl, 150; riboflavina, 100; piridoxina HCl, 50; ácido pantoténico, 100; niacina, 300; biotina, 1; inositol, 500; ácido fólico, 20; cianocobalamina, 0.1. ICN Biomedical Inc, Aurora, Ohio USA.
Lecitina de soya: ODONAJI® Distribuidora de alimentos naturales y nutricionales S.A. de C.V. México, D.F.
Premezcla mineral (g / kg of diet): KCl, 0.5; MgSO4.4H2O, 0.5; ZnSO4.7H2O, 0.09; MnCl2.4H2O, 0.0234; CuCl2.2H2O, 0.005; KI, 0.05; CoCl2.6H2O, 0.0025; Na2HPO4, 2.37. SIGMA CHEMICAL CO. St Louis MO USA.
Cloruro de colina: ICN Biomedicals, Inc. 101386
Vitamina C Stay-C: (L-ascobil-2-polifosfato 35% activity C), Roche Vitamins Inc., Parsippany, Nj, USA
BHT: Butylated hydroxytoluene, ICN 101162.

La cantidad de proteína contenida en la dieta con langostilla, fue compensada con otras fuentes proteicas como la harina de desechos de atún, harina integral de trigo y pasta de soya.

La composición química proximal y de energía de los ingredientes utilizados para la fabricación de los alimentos experimentales se presenta en la Tabla II y la Tabla III muestra la composición química proximal de los alimentos experimentales.

Tabla II. Composición química proximal y de energía de los ingredientes utilizados en la fabricación de los alimentos experimentales del experimento.

Código de Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra Cruda	Cenizas (%)	ELN (%)	Energía (Cal/g)
Harina de Pescado	5.7 ± 0.1	67.5 ± 0.4	11.1 ± 0.0	0.03 ± 0.07	18.2 ± 0.1	3.1	4725 ± 33
Harina Integral de Trigo	10.3 ± 0.04	12.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.33 ± 0.06	0.6 ± 0.0	86.1	4086 ± 22.8
Pasta de Soya	8.1 ± 0.1	52.0 ± 0.3	1.6 ± 0.0	2.50 ± 0.3	7.9 ± 0.0	36.0	4478 ± 29.6
Harina de Langostilla	2.3 ± 0.1	33.7 ± 0.1	7.0 ± 0.1	13.2 ± 0.0	32.3 ± 3.9	13.8	3162 ± 46.6

Valores promedio ± desviación estándar de 3 réplicas por muestra. Resultados expresados en base seca, excepto humedad.

Tabla III. Composición química proximalde los alimentos experimentales.

Composición proximal (g/100 g de materia seca)	**HP**	**HL**
Proteína cruda	41.6	41.8
Extracto etéreo	7.2	6.9
Fibra cruda	8.5	6.1
Cenizas	9	15.2
E.L.N.	33.7	30
Energía bruta (Cal/gr)	4428	4232

6.2. Organismos experimentales.

Se obtuvieron postlarvas de camarones de la especie *L. vannamei* (Boone, 1931), donadas por la empresa Acuacultura Mahr (La Paz, B.C.S., México). Los organismos fueron aclimatados dentro de las instalaciones de las Universidad Autónoma de Baja California Sur unidad Pichilingue en tanques de fibra de vidrio con capacidad 2,000L a una temperatura de 27°C y salinidad de 35 UPS. Los camarones fueron alimentados dos veces al día con un alimento comercial con 35% de proteína, hasta que alcanzaron el tamaño requerido para el experimento..

6.3. Diseño experimental y sistema de cultivo.

Se utilizaron 360 camarones con peso promedio de 0.25 ± 0.01g, estos se distribuyeron aleatoriamente en 12 tanques de fibra de vidrio con capacidad de 200 L (Figura 1), a una densidad de 30 organismos por tanque, con 6 réplicas por tratamiento.

Al inicio del experimento el alimento se suministró a razón de 10% de la biomasa, y posteriormente se ajustó en función del consumo diario a manera de que siempre hubiera un

poco de excedente. El alimento fue distribuido manualmente en dos raciones diarias (50% a las 8 am y 50% a las 3 pm) durante 31 días.

Figura 1. Tanques de fibra de vidrio del sistema de cultivo utilizado en el experimento.

Diariamente se monitoreaba la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto con un equipo multiparàmetros. Todos los días por mañana los restos de alimento no consumido, heces y mudas fueron extraídos de los tanques por sifoneo con la ayuda de una manguera y posteriormente se realizaba un recambio de agua equivalente al 50% del volumen total.

Los criterios para evaluar los dos tratamientos fueron: supervivencia, ganancia en peso y factor de conversión alimenticia, mismos que se calcularon usando las siguientes ecuaciones (Tacon, 1989).

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\textit{N° organismos inicio}}{\textit{N° organismos final}} * 100$$

$$\text{Ganancia en peso (g)} = \textit{Biomasa final} - \textit{Biomasa inicial}$$

$$\text{Factor de Conversión Alimenticia} = \frac{\textit{Alimento total consumido (g)}}{\textit{Incremento en peso corregido (g)}}$$

Incremento en peso corregido =

$$\textit{Biomasa final} + \left[\frac{\textit{Peso promedio final} + \textit{Peso promedio inicial}}{2} * \textit{N° Muertos}\right] - \textit{Biomasa inicial}$$

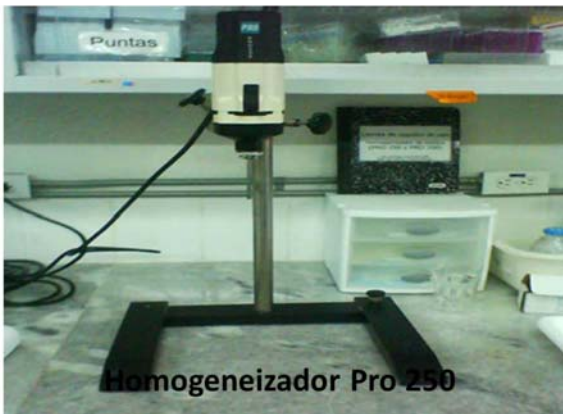
Una vez concluido el bioensayo, los camarones fueron contados y pesados en una balanza digital con precisión de 0.1 a 400g. Se seleccionaron los organismos en estadio de intermuda "C", que se determinó por medio de la observación del desarrollo setal de los urópodos de acuerdo a lo descrito por Robertson et al., (1987) y; Smith y Dall, (1985).

Los camarones en estadio de intermuda fueron disectados para separar los intestinos completos (Figura 2).

Figura 2. Sistema digestivo de *Litopenaeus vannamei*

Una vez obtenido el intestino fue almacenado a -80°C, posteriormente se realizaron extractos, una parte fue almacenada en tampón RNA later para su posterior extracción de ARN y la otra se utilizó para realizar análisis de actividad enzimática digestiva.

6.4. Extracción de ARN total (TRIZOL™ Invitrogen).



El tejido conservado a -80°C fue homogenizado con la ayuda del homogeneizador Pro 250 y se extrajo el ARN total de cada muestra con el método de TRIZOL (Anexo 1). El ARN obtenido se resuspendió en 40 µl de agua DEPC 0.1%, se cuantificó la concentración obtenida utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific) y se evaluó la calidad por electroforesis en gel, mezclando 5 µl de la muestra de ARN con 1 µl de buffer de carga (LB[50% glicerol, 0.1 M EDTA pH 8.0,

0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol) de cada una de las muestras e inyectándolas en los pozos de un gel de agarosa al 1% con TAE (Tris, Ácido acético, EDTA) desnaturalizante con tiocianato de guanidina (0.06 gramos/ 100mL), preteñido con 1µl de Bromuro de Etidio (10mg/mL).La electroforesis se llevó a cabo a 70V durante 1 hora. Finalmente, la imagen fue registrada mediante un sistema de fotodocumentación con luz UV (BioDoc-It, ImagingSystem UVP).

El ARN total obtenido fue tratado con DNAsa, para eliminar el ADN contaminante: para esto, por cada muestra se tomó 1 µg de ARN, 1µl de Buffer DNAsa, 1µl de la enzima DNAsa y se agregó agua DEPC hasta obtener un volumen final de 10µl, se agitó suavemente cada muestra y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Al término del tiempo de incubación se detuvo la reacción al agregar 1µl de EDTA 25mM y se incubó a 65°C por 10 min.

6.5. Síntesis de cDNA (RT-PCR).

Se reunieron en un "pool" concentraciones equimolares de 12 ARN´s de intestinos de camarón blanco alimentados con harina de pescado (control) y en otro pool 24 ARN´s de intestino de los camarones alimentados con harina de langostilla (experimental). De cada pool se tomaron 10 µl de ARN total tratado con DNAsa y se les agregó 2 µl de oligodT 20mM y Random primers (3 µg/µl) y agua para completar un volumen de 19.0 µl. Fueron incubados a 70°C durante 10 minutos. Al término del tiempo de incubación se procedió a la retrotrascripción, para preparar el aminoalilcDNA (aacDNA), el cual fue posteriormente purificado y conjugado con los fluoróforos Alexa$_{555}$ y Alexa $_{647}$ (Tabla IV), (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

6.6. Hibridación de un microarreglo heterólogo.

La hibridación de las muestras se llevó a cabo en las instalaciones del CIBNOR. Los cDNA´s de camarones de los tratamientos control y langostilla fueron hibridados en un microchip con oligos inmobilizados provenientes del genoma total (15,139 genes) de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, en el Anexo 2 se detalla el protocolo completo.

La lectura se realizó en un lector de microarreglos (Genepix 4100 A) y los archivos generados por el lector fueron procesados con el software Genepix.

Posteriormente, con la ayuda del software libre Genarise, se analizaron los datos obtenidos en el microarreglo, mediante el cual se conocieron aquellos genes sobre-expresados por arriba de un umbral fijado en 2 (Z score) y los reprimidos por abajo del inverso de 2.

Finalmente, a través de la herramienta de uso público DAVID (http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/), fue posible conocer aquellas rutas metabólicas y genes específicos sobre-expresados y reprimidos en el intestino de camarones alimentados con el alimento experimental (harina de langostilla), con respecto al alimento control (harina de pescado).

Tabla IV. Marcaje de ARN de los tratamientos.

Tratamiento	Fluoróforos
HP (Control)	Alexa 647
HL	Alexa 555

6.7. Validación del microarreglo por PCR en tiempo real (qPCR).

Una etapa imprescindible en los análisis de las diferencias de expresión con microarreglos es la validación de algunos resultados a través de qPCR. El primer paso al medir la cantidad de expresión por qPCR es la selección y validación de genes de referencia, estos son los genes que se utilizan como controles internos y que permiten corregir las diferencias en las medidas de expresión no debidas al tratamiento sino a diferencias técnicas (cantidades, pipeteo, eficacia en la síntesis de ADN copia, etc).

La expresión diferencial de los genes identificados fue confirmada mediante PCR en tiempo real, el intercalador fluorescente con alta afinidad por ADN, SsoAdvanced™ SYBR Green® BIO-RAD (Tabla V).

La cuantificación de la expresión fue basada en la curva de amplificación estándar, obtenida de una serie de diluciones seriales de cDNA (1/4, 1/16, 1/64 y 1/256) obtenido a partir de la retrotrascripción de cada una de las muestras utilizando ImProm II de Promega más los componentes de la reacción indicados en la Tabla V. Mezcla para una reacción de RT-PCR empleando SYBR Green

La cuantificación se llevó a cabo en el termociclador CFX 96 Touch ™Real-Time PCR Detection System con las condiciones indicadas en la Tabla VI.

Tabla V. Mezcla para una reacción de RT-PCR empleando SYBR Green

Primer	1 reacción (µl)
SYBR Green	7.5
Primers	0.25
Agua estéril	2.0
Volumen total	10

*SYBR Green (dNTP'S, Taq, Mg++), Primers (fwd y rev).

Tabla VI. Parámetros del ciclo térmico que se utilizó para la amplificación de las secuencias.

	Temperatura °C	Tiempo	No. de ciclos
Activación enzimática	95	30 seg.	1
Desnaturalización inicial del ADN	95	5 seg.	1
Alineación de los primers y extensión de producto	60	30 seg.	40
Curva de disociación	65- 95 °C	2-5 seg.	1

6.8. Proteína soluble.

Se determinó la concentración de proteína soluble expresada en mg/mL de todos los extractos de acuerdo al micrométodo Bradford (1976). Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar, hasta una concentración máxima de 25 µg/ml.

La determinación de proteína en los extractos se realizó en tubos de vidrio de 100 x 15 mm. La de reacción consistió en 5 µl de extracto, 795 µl de agua destilada y 200 µl de reactivo de Bradford. Se agitó en el vortex y se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm.

6.9. Análisis de actividad enzimática.

Se evaluó la actividad específica de las enzimas digestivas amilasa, aminopeptidasa N, quimotripsina y tripsina la cual se expresa en unidades de actividad de la enzima por miligramo de proteína (U/mg), los análisis se realizaron por triplicado y con un testigo.

Para las determinaciones enzimáticas, el tejido provenientes de 18 organismos por cada tratamiento fue pesado en una balanza analítica y resuspendido en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7.0) en una proporción 1:4 (peso/volumen). El tejido fue macerado con un homogeneizador tipo Polytrón (PRO 250, 5 mm x 150 mm).

Los extractos fueron centrifugados a 20,000 g, por 15 min. a 4°C y el sobrenadante (extracto enzimático) fue recuperado y almacenado en congelación a -20° C hasta los ensayos enzimáticos.

6.9.1. Actividad amilasa.

La actividad amilasa se determinó midiendo la producción de azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de almidón de acuerdo al método descrito por Vega-Villasante et al., (1993) usando almidón como substrato. Para esto se utilizaron tubos de vidrio de 16x150 con tapón de rosca (cuatro tubos por muestra; tres problemas y un testigo) a los que se agregaron 500 µl de Tris-HCl (50 mM, pH 8), 10 µl de extracto y 500 µl de almidón soluble (1% en Tris-HCl a temperatura ambiente) y se agitaron. El tiempo de incubación que fue de 10 minutos a temperatura ambiente, se contó a partir del primer tubo al que se le colocó el almidón. Posteriormente se agregaron 200 µl de Carbonato de Sodio (2N) y 1.5 ml de reactivo DNS, en caso del tubo testigo, los 10 µl de extracto se añadieron después de agregar el DNS, se agitaron y se taparon los tubos para después ponerlos a ebullición en baño María por 15 min. Una vez transcurrido ese tiempo se sacaron del baño y se les agregó 7.3 ml de agua destilada y por último se agitaron y se leyó la absorbancia a 550 nm.

6.9.2. Actividad aminopeptidasa N.

La actividad aminopeptidasa se determinó por el método de Maroaux (1973), utilizando como sustrato Leucina p-nitroanilida (0.1 mM). Se disolvió el sustrato en 200 µl de DMSO y se aforó con 100 mL del buffer de fosfato sódico 50 mM (pH 7.2). La reacción se inició con 10 µl de extracto problema en 950 µl de sustrato, y se incubó por 10 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción con 250 µl de ácido acético 30 % y se leyó en un espectrofotómetro a 410 nm.

6.9.3. Actividad quimotripsina.

La actividad quimotripsina se evaluó a 414nm por liberación del grupo nitroanilinadel sustrato sintético N-succinil-Ala-ala-Pro-Phepnitroanilida (SAPNA) disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) y diluido en el amortiguador Tris-HCl 60 mM y $CaCl_2$ (del Mar et al., 1979). La reacción se inició al mezclar 10 µl de extracto crudo, 170 µl de Tris-HCl 60mM, pH 8.0, 10µldeCaCl2 (192mM, en Tris-HCl, pH 8.0) y 10 µl SAAPNA (9.6 mM). Se agitó en el equipo 30 segundos a 1500 rpm y se leyó la absorbancia a 414nm cada 30 segundos durante 30 minutos.

6.9.4. Actividad tripsina.

La actividad tipo tripsina se determinó siguiendo el método de Erlanger et al., 1961. Se preparó una solución de 96mM de BAPNA (Na-Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida) en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se aforó a 100 mL usando solución amortiguadora (60 mM de Tris-HCL y 192mM $CaCl^2$ a pH 8.0).

Para iniciar la reacción se mezclaron 10µl de extracto crudo 170 µl de Tris-HCl 60mM, pH 8.0. 10 µl de CaCl2 (192mM, en Tris-HCl, pH 8.0) y 10µl de BAPna (9.6 mM).Se agitó la microplaca por 30 segundos a 15,000 rpm. Después de un tiempo de incubación lineal, la reacción se detuvo con la adición de 0.25 mL de ácido acético al 30%. A continuación, se midió la absorbancia a 414nmcada 30 segundos durante 30 minutos.

***6.10. Análisis* estadísticos.**

Para el análisis de datos se utilizó el software estadístico *STATISTICA* versión 6.0, evaluando la normalidad de datos con el test de Kolgomorov-Smirnov, y la prueba de Levene para homocedasticidad. Posteriormente, se realizaron análisis de varianza de una vía a fin de determinar diferencias significativas entre los dos tratamientos y la prueba de Tukey, cuando existieron diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%.

7. RESULTADOS

7.1. Bioensayo de crecimiento.

Los parámetros fisicoquímicos del agua se mantuvieron constantes durante todo el bioensayo: temperatura (27-27.5°C), salinidad 35UPS y oxígeno (5.4- 5.6mg/L), y no se detectaron diferencias significativas entre los dos tratamientos (P≥0.05). La Tabla VII muestra un resumen de los resultados zootécnicos y la utilización del alimento durante el bioensayo.

Tabla VII. Resultados zootécnicos y utilización del alimento durante el bioensayo de crecimiento con juveniles de *L. vannamei*.

	HP	HL
Supervivencia	99.4%	99.4%
Peso Final	2.66g	4.05g
Ganancia en Peso	2.40g	3.94g
Alimento Ingerido	127.3g	171.5g
FCA	1.80	1.61

En relación a la supervivencia, esta fue de 99.4 ± 1.4%, tanto para el tratamiento Control, como para el de langostilla, y por tanto no se encontraron diferencias significativas (P≥0.05) entre tratamientos (Figura 3).

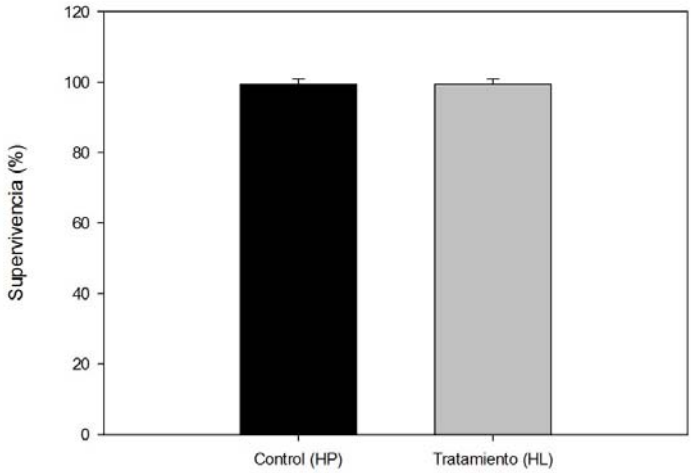


Figura 3. Supervivencia final (media ± D.E.) de juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 31 días con el alimento Control (HP) y el alimento con harina de langostilla (HL). Letras iguales sobre las barras indican la ausencia de diferencias significativas (P≥0.05).

El peso final y la ganancia en peso (4.05 ± 0.18g; 3.94 ± 0.18g) de los juveniles de camarón que fueron alimentados con el alimento que contenía harina de langostilla fueron significativamente más elevados (P≤0.05) que en aquellos alimentados con el alimento Control (2.66 ± 0.11g; 2.40 ± 0.12g) (Figura 4).

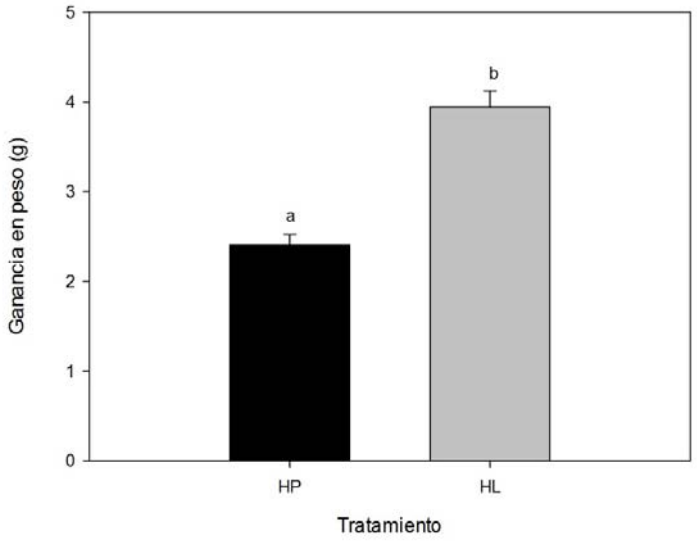


Figura 4. Ganancia en peso final (media ± D.E.) de juveniles de L. vannamei alimentados durante 31 días con el alimento Control (HP) y el alimento con harina de langostilla (HL). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. (P≤0.05).

La cantidad total de alimento suministrado para el grupo alimentado con harina de langostilla fue de experimental fue de 171.5 ± 15.3 g para HL y 127.3±11.2 g para HP.

Se obtuvieron valores de factor de conversión alimenticia de 1.80 ± 0.2 para el alimento Control y de 1.61 ± 0.1 para el alimento con harina de langostilla. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos (P>0.05) (Figura 5).

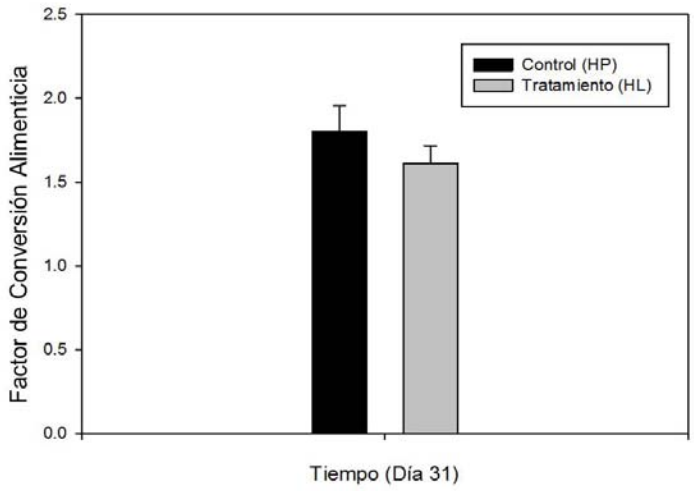


Figura 5. Factor de conversión alimenticia al final (media ± D.E.) de juveniles de *L. vannamei* alimentados durante 31 días con el alimento Control (HP) y el alimento con harina de langostilla (HL). Letras iguales sobre las barras indican la ausencia de diferencias significativas ($P \geq 0.05$).

7.2. Extracción de ARN total.

Se extrajo el ARN total de cada una de las muestras de intestino con el método de TRIZOL (Figura 6), y se evaluó su integridad en geles de agarosa desnaturalizantes adicionados con tiocianato de guanidina (120mg/ml) al 0.8% preteñidos con bromuro de etidio. Una vez confirmada la pureza del ARN se procedió a realizar la transcripción reversa del mismo a ADN complementario (cDNA).

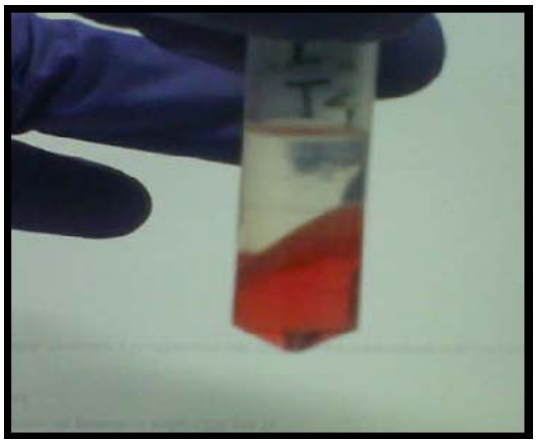


Figura 6. Extracción del ARN total con el método TRIZOL. Se obtuvieron 3 fases; se recuperó la superior acuosa incolora (ARN), que representa el 60% del volumen de Trizol utilizado para la homogenización. Las fases restantes corresponden a restos celulares como proteína (intermedia) y al ADN (fase rojiza).

7.3. Análisis de microarreglo heterólogo.

En la Figura 7 se presentan las imágenes de las laminillas del microarreglo obtenidas por el lector de microarreglos (Genepix 4100 A) con la ayuda del software Genepix, de las muestras de intestino de camarones alimentados con los alimentos experimentales durante 31 días.

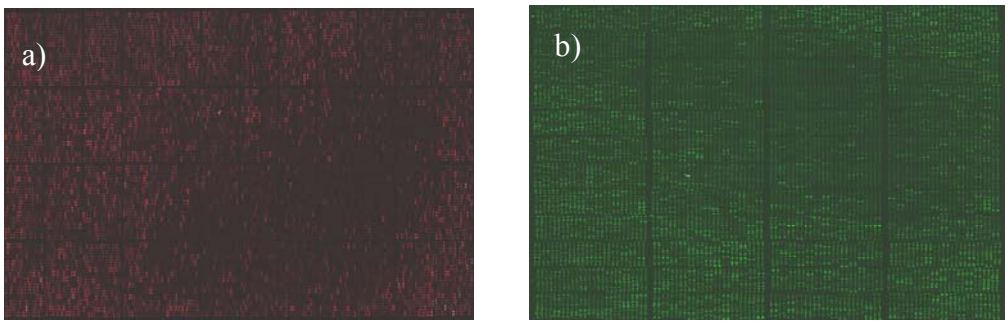


Figura 7. Fotografías de laminillas tipo microarreglo a) correspondientes a intestifnos de camarones alimentados con el alimento control (HP) y b) de intestinos de camarones alimentados con el alimento experimental (HL).

La Figura 8 muestra de manera gráfica los genes detectados en el microarreglo con la ayuda del software GenArise. Se identificaron 416 genes sobre-expresados por arriba del umbral fijado en 2 (Z score) y 302 genes reprimidos por abajo del inverso de 2 en el intestino.

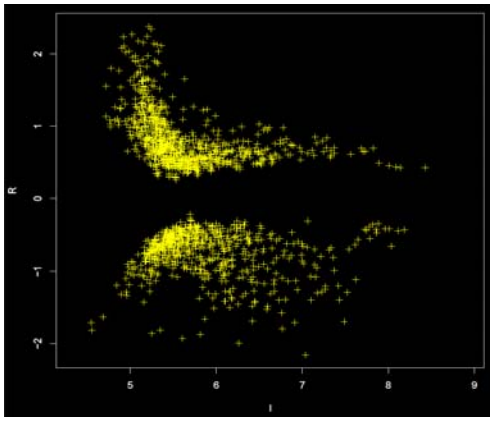


Figura 8. Genes sobre-expresados por arriba del umbral de 2 (Z score) y genes reprimidos por abajo del inverso de 2, obtenidos con la ayuda del software GeneArise.

Los genes obtenidos fueron analizados en DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). De los 416 genes sobre-expresados, 179 no se encontraron anotados y 238 fueron examinados. Así también, de los 302 reprimidos, 129 no se encontraron anotados y 173 fueron examinados.

El análisis de anotación clasificó a los genes de acuerdo a sus categorías funcionales, ontologías (procesos biológicos, componentes celulares y función molecular), vías metabólicas y dominios de proteínas. Las bases de datos utilizadas fueron elegidas de acuerdo al mayor número de genes presentes en las mismas (Tabla VIII, IX, X, XI).

Tabla VIII. Anotación funcional (DAVID) de genes sobre-expresados en el microarreglo heterólogo (*D. melanogaster*) de genes en el intestino camarones alimentados con harina de langostilla.

Anotación		Base de datos	Genes sobre expresados (%)	Núm. de Genes
Categorías funcionales		SP_PIR_KEYWORDS	95.9%	236
Ontología de Genes	Procesos Biológicos	GOTERM_BP_FAT	29.3%	72
	Componentes Celulares	GOTERM_CC_FAT	16.7%	41
	Procesos Moleculares	GOTERM_MF_FAT	46.3%	114
Vías Metabólicas		KEGG_PATHWAY	12.2%	30
Dominios de Proteínas		INTERPRO	72.4%	178

Tabla IX. Anotación funcional (DAVID) de genes reprimidos en el microarreglo heterólogo (*D. melanogaster*) de genes en el intestino camarones alimentados con harina de langostilla.

Anotación		Base de datos	Genes sobre expresados (%)	Núm. de Genes
Categorías funcionales		SP_PIR_KEYWORDS	95.1%	173
Ontología de Genes	Procesos Biológicos	GOTERM_BP_FAT	25.8%	47
	Componentes Celulares	GOTERM_CC_FAT	15.9%	29
	Procesos Moleculares	GOTERM_MF_FAT	40.1%	73
Vías Metabólicas		KEGG_PATHWAY	8.8%	16
Dominios de Proteínas		INTERPRO	61.5%	112

Tabla X. Procesos biológicos mayormente representados entre la expresión diferencial de genes sobre expresados presentes en el intestino de camarón, basado en el análisis DAVID.

Term	Count	%	P-Value	Benjamini
Proteolysis	15	6.6	0.0027	0.88
serine family amino acid metabolic process	3	1.3	0.0078	0.64
serine family amino acid metabolic process	2	0.9	0.05	0.99
glycine catabolic process	2	0.9	0.05	0.99
monovalent inorganic cation transport	5	2.2	0.06	0.98
glycine metabolic process	2	0.9	0.073	0.98
phospholipase A1 activity	3	1.2	0.0087	0.88
triacylglycerol lipase activity	4	1.6	0.014	0.82
peptidase activity	16	6.5	0.022	0.83
peptidase activity acting on L-amino acid peptides	15	6.1	0.029	0.83
lipase activity	5	2.0	0.031	0.79
endopeptidase activity	12	4.9	0.037	0.78
aminomethyltransferase activity	2	0.8	0.052	0.84
carboxylesterase activity	5	2.0	0.052	0.80
diphotransferase activity	2	0.8	0.064	0.83
metalloendopeptidase activity	4	1.6	0.088	0.89

Tabla XI. Procesos biológicos mayormente representados entre la expresión diferencial de genes sobre reprimidos presentes en el intestino de camarón, basado en el análisis DAVID.

Term	Count	%	P-Value	Benjamini
nuclease activity	4	2.5	0.045	1.00
secondary active monocarboxylatetransmembrane transporter activity	2	1.2	0.049	0.99
endonuclease activity	3	1.8	0.065	0.98
mitochondrial inner membrane	6	3.7	0.0039	0.22
integral to membrane	15	9.2	0.0055	0.16
organelle inner membrane	6	3.7	0.0055	0.11
intrinsic to membrane	15	9.2	0.0064	0.099
mitochondrial membrane	6	3.7	0.0086	0.11
organelle envelope	7	4.3	0.0089	0.092
Envelope	7	4.3	0.0090	0.080
mitochondrial envelope	6	3.7	0.011	0.088
mitochondrial part	6	3.7	0.067	0.39
organelle membrane	6	3.7	0.083	0.43

7.4. Validación del microarreglo.

En este estudio se seleccionaron dos genes (β-actina y EF1-α) considerados endógenos en diferentes especies y se evaluó su estabilidad en muestras de intestino de camarón blanco. Los análisis de estabilidad se realizaron mediante GeNorm (Pfaffl et al., 2004) (Figura 9) y NormFinder (Vandesompele et al., 2002) (Figura 10), debido a que en estos análisis se encontró que el gen β-Actina presentaba la menor estabilidad de expresión entre los dos genes de referencia se determinó que el gen *EF1* fue el gen más estable en el tejido intestinal del camarón blanco, y por tanto fue el que se usó para la normalización.

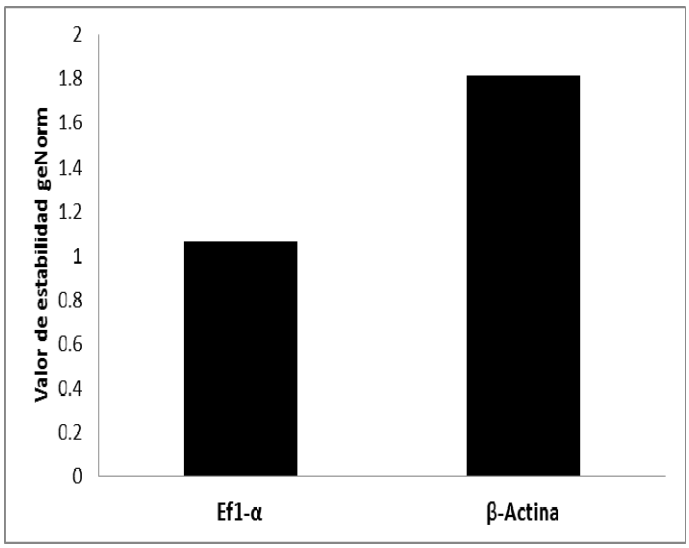


Figura 9. Valores de estabilidad para los genes de referencia obtenidos por geNorm.

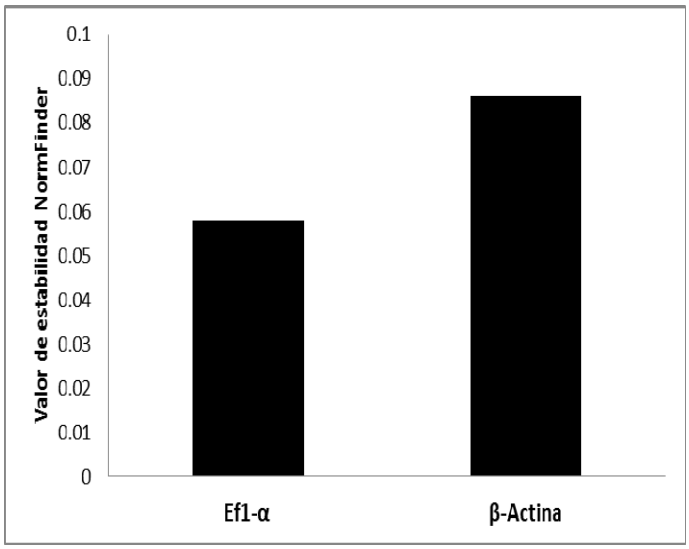


Figura 10. Valores de estabilidad para los genes de referencia obtenidos por NormFinder**.**

Dentro de la base de datos que arrojó la herramienta de uso público DAVID se realizó una selección de genes codificantes para algunas enzimas digestivas a validar por qPCR.

Para ello, se diseñaron dos parejas de cebadores en las regiones específicas de cada transcrito (Tabla XII), lo que permitió determinar específicamente la cantidad de expresión de cada uno, basada en una curva estándar para cada gen (Ver Anexo 4, Figura 1 y 2), obtenida de un serie de diluciones seriales (1/4, 1/16, 1/64 y 1/256) de cDNA, con el fin de

establecer la dilución y el ciclo al cual cada gen alcanza su umbral de detección(Ct) y el 100% de eficiencia de amplificación. Los resultados del análisis por qPCR aparecen representados de forma gráfica en la Figura 11, donde se muestran los niveles de expresión relativa al gene endógeno.

Tabla XII. Secuencia de los primers utilizados para la detección expresión de amilasa (AMY), aminopeptidasa(AMP), quimotripsina (CHY), lipasa (LIP), tripsina (TRY), factor de elongación 1 (EF1) y β-Actina(β-Actin).

Primer	Secuencia	Pb
AMY Fw	5' ATGGCCAGGATAAGAACGACT 3'	137
AMY Rw	5' CATGTTGTAGATCTGCCTCCAG 3'	
AMP Fw	5' TACCATCACACAGGTCTTCAGG 3'	155
AMPRw	5'AAGTAACCATCCTCTCCCCATT 3'	
CHYFw	5' CATCGACGACATGTACTTCTGC 3'	168
CHY Rw	5'GTGAAGAAGTCGGTGGAGGTAA3'	
LIP Fw	5' GCTACAACTTCCTCCTCCTCCT 3'	199
LIP Rw	5' GTGTTCTGTCCGTAGTGGTTCA 3'	
TRY Fw	5' TTACCAGCTCAGTTTCCAGGAC 3'	170
TRY Rw	5' CCACATCCTGGTTAAGTTCTCC 3'	
EF1 Fw	5'CATGTGAAATCTGGTGACTCCT 3'	161
EF1 Rw	5'TGATCCTTCTTGTTGACCTCCT 3'	
β-Actin Fw	5'GGCATCACACTTTCTACAACGA 3'	130
β-Actin Rw	5'GTGTTGAAGGTCTCGAACATGA 3'	

*Fw: forward, Rw: reverse. pb: pares de bases del fragmento amplificado del gen.

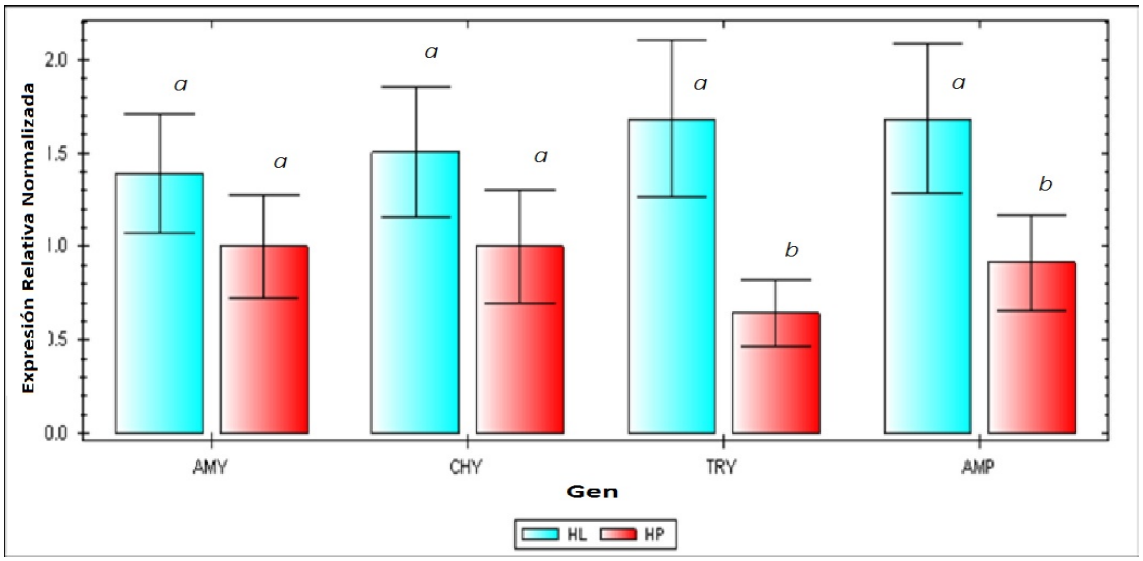


Figura 11. Nivel de expresión de amilasa (AMY), quimotripsina (CHY), tripsina (TRY) y aminopeptidasa (AMP) relativo a gen factor de elongación 1 (EF1α) en juveniles de camarones alimentados con harina de langostilla (HL) y harina de pescado (HP). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (P≥0.05).

7.5. Actividad enzimática.

La actividad enzimática no fue significativamente influenciada por la inclusión de harina de langostilla en el alimento (P>0.05) (Figura 12).

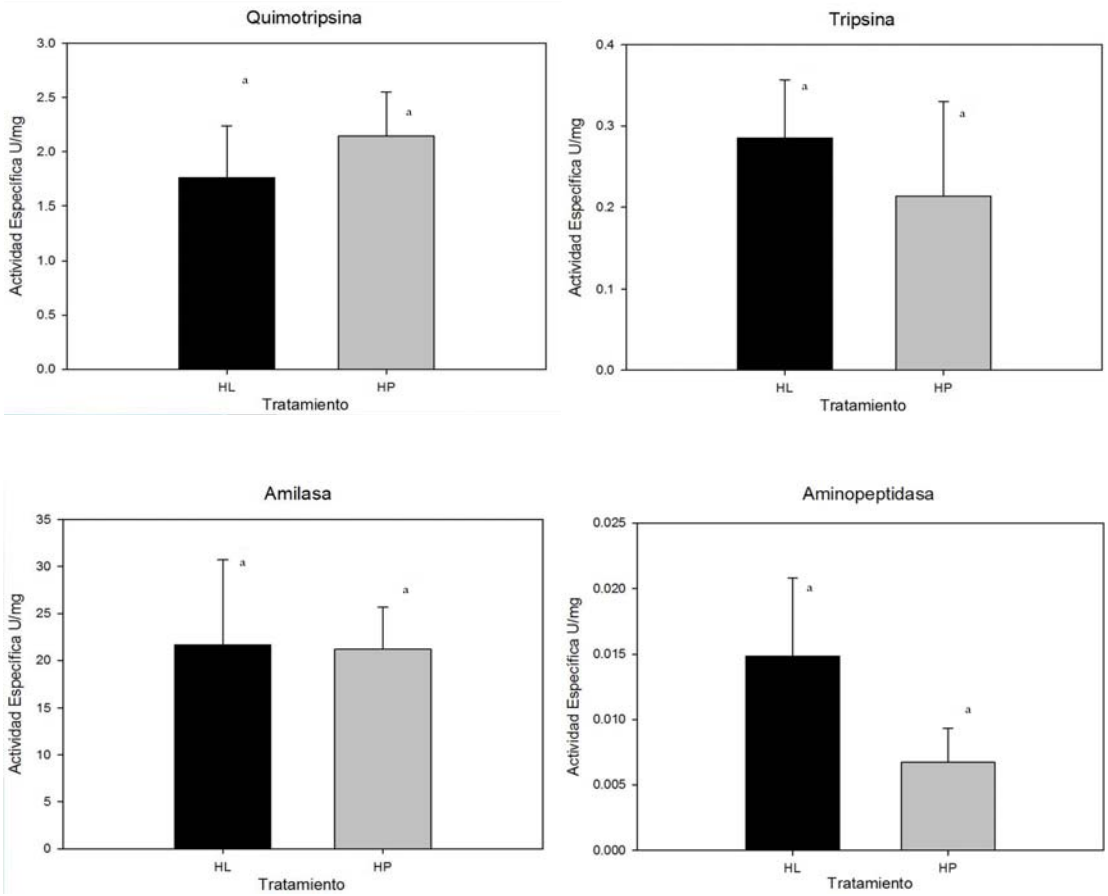


Figura 12. Actividad enzimática digestiva en el intestino de camarones *L. vannamei* alimentados con dos tipos de alimentos: harina de langostilla (HL) y harina de pescado (HP).Se muestran las medias ±D.E. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo los análisis de enzimas digestivas se efectuaron en la fase de intermuda C, puesto que durante este estadio no varía de manera importante la actividad enzimática digestiva. Carrillo y González (2000) reportan que durante la intermuda se encontró correlación entre la actividad de las cisteína proteasas y los niveles de ARNm. Por lo tanto, al disectar los organismos en esta etapa fue posible realizar una comparación entre el análisis de actividad enzimática y el análisis de expresión génica en el intestino de los camarones.

Se han reportado adaptaciones de la actividad enzimática en el hepatopáncreas de camarones peneidos debido al el ayuno, al tamaño de los camarones, a la fuente y nivel de proteína en el alimento y a la muda.

8.1. Bioensayo de crecimiento.

Las condiciones ambientales en las que se desarrolló el experimento fueron las adecuadas para el cultivo de camarón blanco, es decir, la temperatura, salinidad y el oxígeno disuelto se mantuvieron dentro de los rangos recomendados o al menos aceptables para la especie (Teitchert-Codington, 1994) y no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos.

La supervivencia aparente final en el bioensayo fue de 96% y 79% en los camarones alimentados con harina de pescado y los alimentados con harina de langostilla, respectivamente. No obstante, es necesario precisar que en los tanques donde se aplicó el alimento que contenía langostilla, se observó que los organismos eran más activos y cuando eventualmente saltaban, desafortunadamente caían fuera de su tanque de cultivo, porque las tapas de acrílico que fueron utilizadas para cubrir los tanques, no los sellaban totalmente. Si se considera la mortalidad tomando en cuenta únicamente los organismos que se realmente encontraron muertos dentro de los tanques, la sobrevivencia fue de 99.4%, tanto para el tratamiento Control, como para el de langostilla.

Villareal et al. (2006) realizaron un experimento con *L. vannamei* en el cual se sustituyó parcial y totalmente a la harina de pescado por harina de langostilla en el alimento

y la supervivencia fue de 93% para todos los tratamientos, concluyendo que la adición de harina de langostilla no afecta a la supervivencia de los organismos.

En el presente trabajo al inicio del bioensayo, el alimento se suministró a razón de 10% de la biomasa en cada tanque, y posteriormente la ración se ajustó en función del consumo diario, a manera de que siempre hubiera un excedente, debido a esto, se descarta la posibilidad de que haya podido existir canibalismo causado por falta de alimento en los tanques o algún efecto directamente relacionado con el tratamiento langostilla, como una diferencia nutricional.

La aparente mortalidad observada a lo largo del bioensayo es atribuida más bien a tres elementos: 1) sistema experimental de cultivo ya que las tapas de acrílico usadas en los tanques no fueron las más adecuadas, pues no sellaban totalmente los tanques y cuando los organismos saltaban eventualmente caían fuera de su tanque. Cabe mencionar que dicho comportamiento ocurrió principalmente después de los primeros 15 días de iniciado el bioensayo. Esto fue comprobado cada vez que se colectaban y cuantificaban los organismos muertos, ya que estos fueron observados siempre por debajo o aun lado de su tanque correspondiente. 2) al tamaño y vitalidad de los organismos del tratamiento langostilla. El peso ganado por los organismos alimentados con el alimento que contenía harina de langostilla termino siendo más del doble que el de los camarones del tratamiento Control, y por tanto, eran más grandes y tenían más vitalidad probablemente debida a que se encontraban en un mejor estado de nutrición, y por lo tanto eran más activos, lo que les permitió saltar de los tanques con mayor facilidad y morir asfixiados. 3) a un estrés por densidad. No se descarta que, dado que en los tanques del tratamiento langostilla la biomasa/m3 fue mayor que en los tanques Control, haya existido un efecto de estrés por densidad, que provocara que los camarones saltaran con mayor frecuencia y perecieran fuera del tanque de cultivo.

Tampoco se descarta el que el mayor peso de los organismos del tratamiento langostilla, se haya debido a que en algunos de los tanques hubo una disminución de la densidad en términos de organismos/m3, debido a que algunos camarones saltaron fuera de los tanques. Sin embargo, ya son muchos los trabajos previos que han demostrado que la

inclusión de la langostilla en el alimento, induce un crecimiento muy acelerado en los camarones, por lo que se considera que este posible efecto de densidad, es poco probable.

Villarreal et al. (2006) observaron que el crecimiento de juveniles de *L. vannamei* se incrementa al sustituir parcial o totalmente las harinas de pescado, pasta de soya o de cabeza de camarón por harina de langostilla en el alimento. En presente estudio se encontraron resultados similares, ya que el crecimiento se vio acelerado por la inclusión de harina de langostilla como sustituto parcial de la harina de desechos de atún en el alimento.

Los resultados de crecimiento observados en este trabajo, fueron los esperados, puesto que nuestro objetivo fue validar las observaciones previas y analizar la expresión masiva de genes, por medio de microarreglos, para ver si había una correlación a fin de darle una explicación más sólida a este fenómeno.

La ganancia de peso fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) en camarones alimentados con harina de langostilla (Figura 4). Se sabe que la inclusión de harina de langostilla en el alimento aumenta no sólo la atractabilidad y el consumo del alimento sino acelera el crecimiento, aumenta la actividad proteolítica en la glándula digestiva (Goytortúa-Bores et al., 2006) y en algunos casos mejora la digestibilidad de la proteína del alimento (Civera et al., 1992, 1994, 1998; Goytortúa-Bores et al., 2006; Villarreal et al. 2006).

En el presente estudio, se observó un incremento en el consumo de alimento en los camarones alimentados con el alimento que contenía harina de langostilla, y esto probablemente fue provocado por su alta atractabilidad y palatabilidad. Montemayor-Leal (2000) reporta que el extracto de langostilla es un atractante muy efectivo en las dietas para camarón. Según Cruz Suárez et al. (1993) un aumento en la tasa de crecimiento puede ser un resultante del aumento en el consumo de alimento, mismo que pudiera ser una explicación al mejor crecimiento obtenido aquí con el alimento langostilla.

La proteína es el principal nutriente utilizado por el camarón para la formación de tejidos durante su desarrollo (Tacon, 1990), y considerando las diferencias encontradas aquí en las tasas de crecimiento cuando se incluye langostilla, podemos sugerir que ésta mejoró la calidad del aporte proteico del alimento. Debido a que los niveles de energía de los alimentos experimentales fueron muy similares (Tabla III), estos valores no pueden

explicar las variaciones encontradas en las tasas de crecimiento, por lo tanto, las diferencias en el crecimiento podrían explicarse por las proporciones de los ingredientes y la posible interacción entre ellos, más que por el nivel de inclusión (Samain et al., 1980).

Dado que la cantidad calculada de proteína es la misma para ambos alimentos experimentales (isoproteicos), los efectos atribuidos al mejor rendimiento en peso observado con la harina de langostilla, pueden ser explicados al analizar la Tabla XIII, ya que podemos observar que el contenido de arginina y lisina es superior en la harina de langostilla con respecto a las otras harinas, por lo que podría suponer que la tripsina incrementaría más su actividad, ya que ésta hidroliza los enlaces amida y éster de estos dos aminoácidos (http://www.worthington-biochem.com/try/cat.html). Esto no sucede así, ya que a pesar de que la tripsina incrementó su actividad con la adición de harina de langostilla en el alimento (Figura 12) no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Tabla XIII. Contenido de aminoácidos (% en base seca) en los macroingredientes utilizados en los alimentos.

Ingrediente	Arg	Trp	His	Leu	Met	Ileu	Lys	Phe	Tyr	Thr	Val	Gly	Cys
Harina de desechos de atún	3.42	0.56	1.78	3.81	1.46	2.41	4.04	2.16	1.72	2.31	2.80	-	-
Harina Integral de trigo	0.54	0.15	0.24	0.81	0.18	0.48	0.35	0.58	0.39	-	-	-	0.28
Pasta de soya	2.8	-	1.00	2.79	0.54	2.16	2.41	2.08	1.12	-	-	-	0.55
Harina de langostilla	7.6	-	2.6	6.0	2.1	3.6	6.7	5.0	9.1	3.9	7.9	6.0	-

Terrazas et al. (2010).

El factor de conversión alimenticia no presentó diferencias respecto a los tipos de alimentos ($P \geq 0.05$). Se obtuvieron valores de 1.61±0.1 para el alimento con harina de langostilla y 1.80 ± 0.2 para harina de pescado. A pesar de que no se detectaran diferencias entre los tratamientos, el FCA fue menor en los tanques alimentados con harina de langostilla, lo que indica que se necesita menos alimento con harina de langostilla para aumentar un gramo en masa de los camarones en cultivo.

Para calcular el factor de conversión alimenticia se determinó el incremento en peso corregido Kitabayashi et al. (1971). Este factor corrige en realidad el incremento en biomasa de los organismos en función de la mortalidad, por lo tanto, con esta corrección se elimina en buena medida el posible efecto de la mortalidad sobre FCA. A pesar de ello no se detectaron diferencias significativas en los valores del FCA para los dos alimentos, lo cual coincide con lo observado en otros estudios donde se ha evaluado a la harina de langostilla como ingrediente en alimentos para camarón (Civera et al., 1998; Goytortúa-Bores et al., 2006).

8.2. Análisis de la expresión masiva de genes.

El análisis de microarreglo por medio de la herramienta DAVID (Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis), reveló que hubo 416 genes sobre-expresados, donde sólo 238 estuvieron anotados, de los cuales 68 genes estuvieron implicados en las funciones metabólicas relacionadas con enzimas digestivas como la lipasa, fosfolipasa, triacilglicerol lipasa y peptidasas. Por otro lado, 302 genes fueron reprimidos o subexpresados y sólo 173 fueron analizados.

Los organismos cultivados asimilan los componentes de la dieta y los utilizan para formar las moléculas estructurales de su cuerpo, mientras que otras son usadas como combustible para dar energía en actividades como el movimiento, reproducción, defensa contra parásitos y depredadores, etc. (catabolismo). La síntesis de moléculas para la construcción del cuerpo del organismo se realiza utilizando la energía derivada del catabolismo. Catabolismo y anabolismo forman el metabolismo y este está dirigido y modulado por enzimas específicas para cada una de las reacciones químicas. En este caso, para llevar a cabo la digestión y asimilación de nutrientes provenientes del alimento es necesaria la acción de un gran número de enzimas digestivas que se encuentran en el interior de las células de todos los órganos implicados en la digestión, como el estómago, la glándula digestiva, el intestino y los ciegos pilóricos (Fountoulaki et al., 2005).

Varias investigaciones se han realizado con el fin de determinar las enzimas digestivas endógenas presentes en el hepatopáncreas del camarón *P. vannamei*, es así que se han encontrado enzimas tales como, tripsina, quimotripsina, aminopeptidasas, lipasas,

carbohidrasas, carboxipeptidasas Ay B (Galgani, 1998; Van Hormhoudt and Sellos, 1996; Van Hormhoudt et al., 1995).

Sin embargo, desde 1967 hasta la fecha, los estudios sobre la capacidad digestiva de los camarones se han centrado sólo en la glándula digestiva, por lo que, hasta donde sabemos, no existen estudios de expresión o actividad de enzimas en el intestino u otro órgano que comprende el sistema digestivo del camarón.

Se realizó un Diagrama de Veen para comparar y obtener la relación entre los genes obtenidos en el microarreglo heterólogo (Figuras 13 y 14) del intestino de juveniles (sobre-expresados y reprimidos) y los genes obtenidos de un microarreglo heterólogo de hepatopáncreas de juveniles de camarón blanco cultivados y alimentados bajo las mismas condiciones de cultivo y con los mismos alimentos que los organismos utilizados aquí (Tovar Ramírez, 2013, com. pers.).

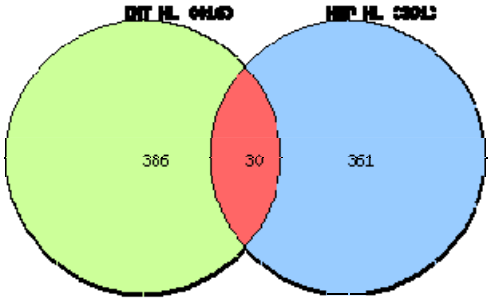


Figura 13. Diagrama de Venn que muestra la relación entre los genes sobre-expresados en el intestino (INT) y el hepatopáncreas (HEP) de organismos alimentados con harina de langostilla (HL).

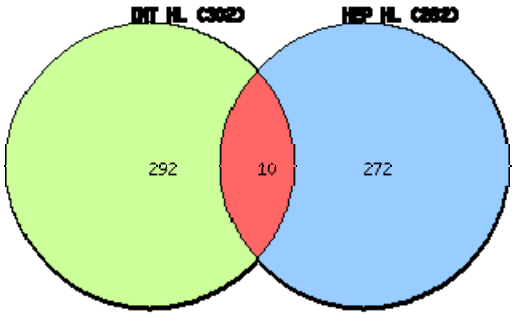


Figura 14. Diagrama de Venn que muestra la relación entre los genes reprimidos en el intestino (INT) y el hepatopáncreas (HEP) de organismos alimentados con harina de langostilla (HL).

El intestino y el hepatopáncreas de los camarones alimentados con el tratamiento langostilla tuvieron en común 30 genes sobre-expresados y 10 genes reprimidos. En el anexo 3 se muestra el ID de cada uno de los genes obtenidos para ambos casos dentro de los cuales se encuentran algunos genes que codifican para enzimas digestivas. Esto demuestra la presencia y la acción de importantes enzimas digestivas en el intestino del camarón blanco *L. vannamei*, que a través de la base de datos que arrojó DAVID, fueron seleccionados aquellos genes implicados en procesos digestivos, tales como la amilasa, aminopeptidasa, tripsina y quimotripsina para ser cuantificados (validación del microarreglo) por PCR en tiempo real.

8.3. Efecto del alimento en la expresión diferencial de genes.

La cuantificación de la expresión de los genes seleccionados por qPCR, se llevó a cabo mediante el uso del gene de referencia EF1α, ya que resultó ser el gen estructural con mayor estabilidad, de acuerdo al algoritmo de GeNorm y NormFinder (http://www.leonxie.com/referencegene.php).

Son numerosos los reportes donde este gen es empleado como referencia para conocer la expresión relativa de los genes de interés, ya que se ha demostrado que es muy estable (Dhar et al., 2009; Karoonuthaisiri et al., 2009).

La tripsina y la quimotripsina son las proteasas más abundantes en la glándula digestiva de dacápodos, ya que según (Galgani et al., 1984) pueden representar hasta un 60% de la proteólisis. Se sabe que son varias las causas que producen incrementos en la actividad de estas enzimas, entre las cuales están los hábitos alimenticios y la fuente de proteína (composición), que afectan la síntesis de enzimas proteolíticas (Le Moullac and van Wormhoudt, 1994). Además existen también factores que regulan la expresión de los genes en diversos niveles, esto significa que estas enzimas pudieron estar siendo reguladas a un nivel transcripcional y/o traduccional por los efectos observados en este trabajo como por ejemplo el incremento en el consumo de alimento en camarones alimentados con langostilla.

Por un lado, la actividad de tripsina no es diferente entre los camarones alimentados con harina de pescado y langostilla, mientras que en los niveles de trascritos (ARNm) en el

grupo alimentado con langostilla sí existe tal diferencia con respecto al Control. Se sabe que en ratas la tripsina es modulada transcripcionalmente por el contenido de proteína (Lhoste et al., 1994) sugiriendo que puede existir una regulación hormonal que afecta a nivel transcripcional que explique el comportamiento observado en la tripsina. También existen diversos ejemplos en peces, donde los niveles de proteasas y su respectivo ARNm, son modificados dependiendo de los niveles de proteína y carbohidratos administrados (Pères et al., 1998).

Para la determinación de la expresión de la lipasa se presentaron problemas de diseño de primers, puesto que tanto la curva de disociación y la curva de calibración así lo demostraron, por lo que no fueron usadas para realizar su cuantificación en el presente trabajo (resultados no mostrados).

8.4. Actividad enzimática digestiva.

Un análisis en expresión diferencial por medio de un microarreglo, permite correlacionar algunos de los resultados de pruebas *in vitro,* como actividad enzimática específica con la expresión de algunos genes en los camarones, debido a que el conocimiento de la actividad enzimática digestiva permite comprender los mecanismos de digestión y eventualmente permite diseñar la composición del alimento para una mejor nutrición de las especies cultivadas.

En el presente estudio fue posible obtener datos de ambas mediciones expresión genética y actividad enzimática.

Respecto a la expresión del gen que codifica para tripsina obtuvimos diferencias significativas entre los tratamientos, siendo mayor el resultado obtenido con los camarones alimentados con harina de langostilla y a pesar de que no existen diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre los dos tratamientos, en la Figura 12 se observa que la actividad de esta enzima fue más alta con harina de langostilla. Resultados similares se obtuvieron para aminopeptidasa. En cuanto a las enzimas quimotripsina y amilasa, los resultados obtenidos para la actividad enzimática y expresión de genes no hubo diferencia significativa en ambos tratamientos.

Van Wormhoudt (1980) menciona que la variación en la síntesis de enzimas digestivas está en función de la cantidad de alimentos asimilables. Las actividades enzimáticas parecen responder en menor tiempo a estas diferencias en la composición de los alimentos que la tasa de crecimiento (Chen y Fu Lin, 1992).

Varios factores pueden ser mencionados para explicar la variación en los resultados reportados por diferentes autores, entre éstos, se pueden mencionar las condiciones experimentales, estación del año, horas de muestreo, métodos analíticos, etc. La técnica utilizada para analizar la actividad enzimática (espectrofotometría) es una técnica sencilla y precisa, pero su sensibilidad es reducida cuando la actividad enzimática es baja, como ocurrió en el presente trabajo.

El contenido de minerales en el alimento con langostilla, puede ser de significativa importancia en la actividad de las proteasas puesto que es sabido que los algunos minerales como el manganeso, el hierro y el zinc (Keen et al. 1984; Wedler, 1994; WHO, 1996; Bengoa et al. 1987) pueden actuar como activadores de proteasas otros enzimas digestivas (Chun y Sun, 1993).

El patrón observado para la expresión de las proteasas digestivas tripsina y aminopeptidasa pudo traducirse en una mayor digestibilidad de las proteínas administradas, y posiblemente, en un mayor crecimiento de los juveniles. Desafortunadamente, dicha hipótesis no puede ser comprobada con los resultados de actividad enzimática digestiva obtenidos en este trabajo debido a que no se realizaron análisis de digestibilidad de ningún tipo.

Por otro lado, se comparó la actividad específica de las cuatro enzimas digestivas del intestino evaluadas en este trabajo con las del hepatopáncreas de camarón blanco dentro de las mismas condiciones de cultivo, para observar a qué nivel contribuye la actividad enzimática del intestino en el proceso digestivo del camarón (Figura 15).

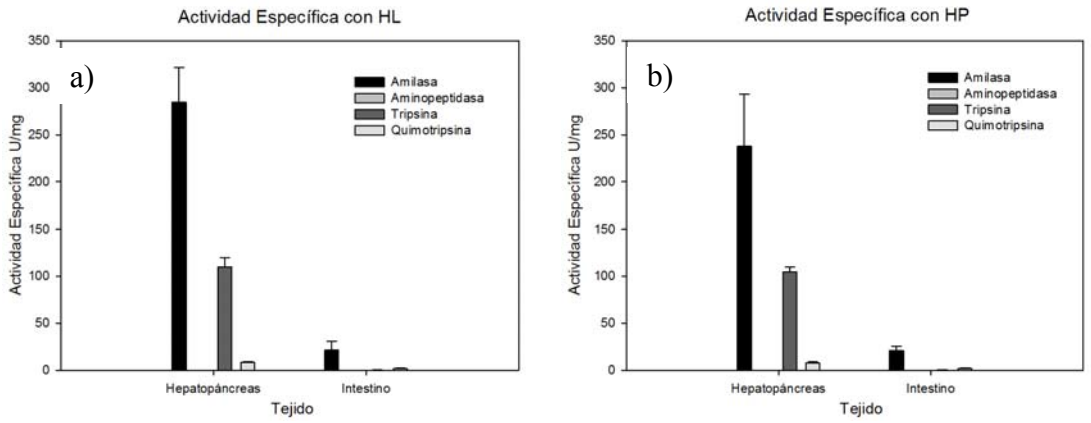


Figura 15. Actividad específica (U/mg) de diferentes enzimas digestivas en intestino y hepatopáncreas; a) tejido de camarones alimentados con harina de langostilla y b) tejido de camarones alimentados con harina de pescado.

La actividad específica obtenida en el hepatopáncreas es más alta para las cuatro enzimas estudiadas que la obtenida en el intestino para los dos tratamientos.

Para tener una visión más clara, en la Figura 16 se muestran por separado los resultados de actividad específica de los dos tejidos, con los dos alimentos, y para cada enzima.

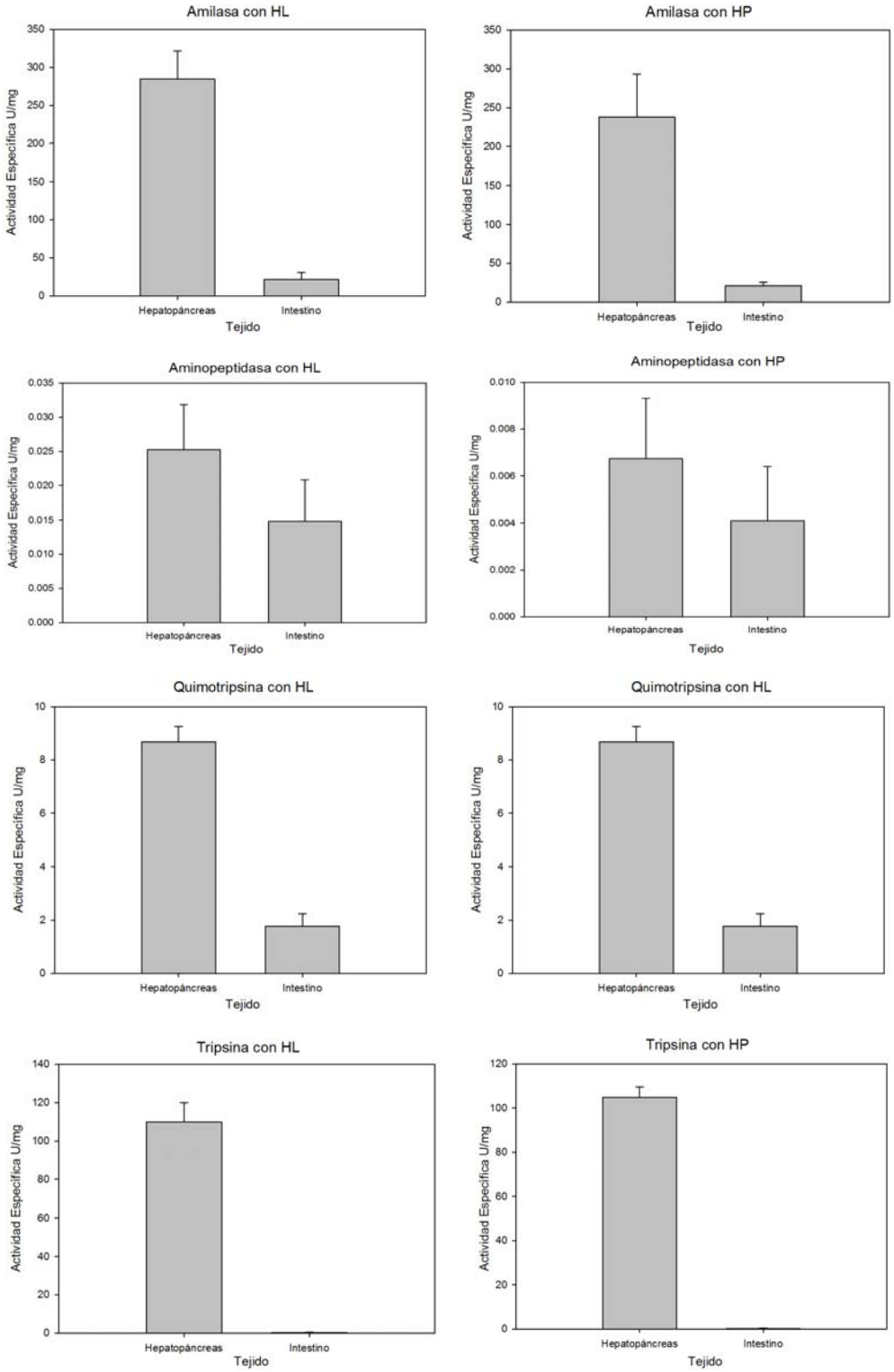


Figura 16. Actividad específica de las cuatro enzimas analizadas en camarones alimentados con harina de langostilla (HL) y harina de pescado (HP) en hepatopáncreas e intestino.

El mismo patrón fue observado para las cuatro enzimas, y a pesar de que las unidades de actividad son muy diferentes entre los dos tejidos, y que la actividad es mayor en hepatopáncreas, con este análisis es posible comprobar que, aunque no al mismo nivel que el hepatopáncreas y que la actividad enzimática obtenida en el intestino pudiera deberse a actividad residual, el intestino contribuye en la acción de estas cuatro en enzimas dentro del proceso digestivo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei.*

Hoy en día existe un gran interés por el estudio de la microbiota en el procesamiento de los nutrientes incluidos en el alimento, utilizando enfoques genómicos (Rungrassamee et al., 2013). Wang (2007) evaluó el efecto de los probióticos en la actividad de enzimas digestivas presentes en el intestino de juveniles de *L. vannamei*, sin embargo concluye que no pudo distinguir entre la actividad de las enzimas sintetizadas por el camarón y las sintetizadas por los probióticos. Las enzimas exógenas producidas por los probióticos no pueden contribuir de manera importante en la actividad enzimática total del intestino (Ding et al., 2004; Ziaei-Nejad et al., 2006) y la presencia de los prebióticos puede estimular la producción de enzimas endógenas del camarón.

9. CONCLUSIÓN

Se confirmó que la inclusión de la harina de langostilla en el alimento, como sustituto parcial de la harina de desechos de atún, produjo un aumento en el consumo del alimento y aceleró el crecimiento de camarones juveniles de *L. vannamei*.

La inclusión de la harina de langostilla en el alimento incrementó los niveles de expresión de genes codificantes para tripsina y aminopeptidasa, mientras que no estimuló la actividad de las enzimas probadas en el intestino.

La utilización de un microarreglo heterólogo (*D. melanogaster*) dio información importante para conocer el transcriptoma de *L. vannamei* alimentado con harina de langostilla y esta información pudo ser validada por qPCR.

El presente trabajo es el primer estudio que demuestra la existencia de expresión de genes de las principales enzimas digestivas en el intestino de camarón *L. vannamei* observado por microarreglos y cuantificado por qPCR.

10. RECOMENDACIONES

Evaluar los patrones de la expresión de genes codificantes para algunas hormonas como las digestivas (gastrina (GAS) y la colecistoquinina (CCK), y aquellas implicadas en el crecimiento, metabolismo de algunos aminoácidos clave como arginina, lisina, fenilalanina, valina y glicina, por ejemplo.

Se recomienda hibridizar en un microarreglo específico (homólogo) del camarón blanco.

Realizar una corrida de secuenciación masiva de genes (ARN seq p.e.) para tener más certeza de los transcritos participantes en este experimento.

11. LITERATURA CITADA

Akiyama, D.M, Dominy, W.G. 1989. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. In: "Texas shrimp farming Manual, vol. 1: Grrow-out technology". Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M University, Sea Grant College Program. 50p.

Aurioles-Gamboa, D. 1995. Distribución y abundancia de la langostilla bentónica, *Pleuroncodes planipes* en la Plataforma Continental de la Costa Oeste de Baja California. 59-78pp.

Barclay, M. C., Dall, W., Smith, D. M. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68: 229-244.

Bar-Or, C., Czosnek, H. & Koltai, H. 2007. Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity. Trends in Genetics 23, 200–207.

Beck, S., A. Olek and J. Walter. 1999. From genomics to epigenomics: a loftier view of life. Nature Biotech. 17:114-124.

Berger, C., 2001. Aportes de la Biotecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones. Panorama Acuícola 6 (2), 8-10.

Buckley, B. A. 2007. Comparative environmental genomics in non-model species: using heterologous hybridization to DNA-based microarrays. Journal of Experimental Biology 210, 1602–1606.

Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology 29 23–39.

Brun, G. and Wojtowicz, M. 1976. A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of jonah crab (*Cancer borealis*) and rock crab (*Cancer irroratus*). Comp. Biochem. Physiol., 53 B:387391.

Casillas, H. R. y Magallón, B. F. 1998. Substitución de insumos tradicionales en las dietas para la engorda del camarón. Informe interno. Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S., México.

Castro-González, M., Carrillo-Domínguez, S., Pérez-Gil Romo, F. y Carrillo-Calvo C. 1995. Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos. Capítulo 10. 163-179pp. En Aurioles-Gambia, D. y Balart, E.F. (Eds.) La langostilla: biología, ecología y aprovechamiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S.

Ceccaldi, H. J., 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En: Crustacean Nutrition. In: Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, Vol. 6 (eds. L.R. D'Abramo, D.E. Conklin & .M. Akiyama), pp. 261-291. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Civera, R. and Guillaume, J.C., 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralisation of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. Aquaculture, (77) 145 156.

Civera-Cerecedo, R., Goytortúa –Bores, E., Rocha-Meza, S. and Green-Yee, A. 1992. Utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal as protein source for *Penaeus vannamei* juveniles. Abs. Annual conf. World Aquacult. Soc. 21-25.

Civera R., Villarreal, H, Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Rocha, S., González, M., Goytortúa, E. and Camarillo, M. 1994. Digestive enzymes activity and growth of *Penaeus californiensis* fed diets containing red crab, *Pleuroncodes planipes*, meal as a protein source. World Aquaculture '94, New Orleans. Louisiana, USA.

Civera, R., Villarreal, H., Goytortúa, E., Rocha, S. Vega, F., Nolasco, H., Pastén, J. y Camarillo, T., 1996. La langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína en dietas experimentales para camarón. Presentación en el Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. 11 al 13 de Noviembre de 1996.

Civera, R, Goytortúa, E., Rocha, S., Nolasco, H., Vega-Villasante, F., Balart, E., Amador, E., Ponce, G., Colado, G., Lucero, J., Rodríguez, C., Solano, J., Flores-Tom, A, Monroy, J. Coral, G. 1998. Uso de la langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en la nutrición de organismos acuáticos. 1998. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. CIBNOR 15-18 Noviembre de 1998, La Paz, México.

Chamberlain, G.W., D.L. Hutchins y A.L. Lawrence, 1981. Mono and polyculture of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* in ponds. J.World Maricul.Soc., 12(1) 251-70.

Chen, H.Y and Lin, H. F. 1992. Effects of different Artemia diets on the growth and digestive enzyme activities of early postlarval *Penaeus monodon*. Asian Fisheries Science. 5:73-81.

Cruz-Suarez, L.E 1999. Digestión en camarón y su Relación con la Formulación y Fabricación de Alimentos Balanceados. Avances de Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11 a 13 de Noviembre de 1999. Monterrey, N.L. pp 209.

Cuzon G., C. Cahu., J.F. Aldrin., J.L Messanger., G. Sthepan & M. Mevel. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. Proceedings of World Mariculture Society 11: 410-423.

Cuzon, G., A. Brito, l., Jimenez-Yan, R. Brito, G. Garcia-Tomas, and Gaxiola. 2004. The effect of animal or plant based diets on energy partitioning in selected ontogenetic stages of the shrimp *Litopenaeus vannamei.* Avances de Nutrición Acuícola VII. Memorias de

Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora, México.

De Villez, E.J. 1965. Isolation of the proteolytic enzymes from the gastric juice of the crayfish *Orconectes virilis* (Hagen). Comp. Biochem. Physiol., 14: 577586.

De Villez, E.J. and Buschlen, K.. 1967. Survey of tryptyic digestive enzyme in various species of crustacea. Comp. Biochem. Physiol., 21;541546.

Dhar A., Mehta S., Dhar G., Dhar K., Banerjee S., Van Veldhuizen P., Campbell DR., Banerjee SK. 2009. Crocetin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and tumor progression in a xenograft mouse model. Mol;8(3):711.

Díaz, V., Fraga, R., González, M., Pérez, O., Escobar, A., Contreras, R y Morales, N. 2004. Variación en la calidad del pienso artificial durante el almacenamiento y su efecto sobre el camarón *Litopenaeus schmitti*. III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuacultura.

Díaz-López, M. y Garcia-Carreño, F. L. 2000. Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed productos.In: Haard, N., and Simpson, B. Seafood Enzymes. Chao. 21. NY. Marcel Dekker: 577-618.

Ding, X., Li, Z. J., Chen, Y. Q., Lin, H.Z. ., Yang, Y.Y., Yang, K., 2004. Effects of probiótics on growth and activities of digestive enzymes of *Penaeus vannamei*. J. Fish. Sci. China. 11, 580-584.

Díaz, E., E. López y E. Soto. 1995. Monitoreo Ambiental en Ecosistemas Acuáticos de México. En: C. Aguirre (Ed.) Taller norteamericano sobre monitoreo para la evaluación ecológica de ecosistemas terrestres y acuáticos. Septiembre 18-22. General Technical Report RM-GTR-284. Fort Collins, CO, U.S. Department of Agriculture, Forest Service Rocky Mountain Forest and Range Experimental Station. Pp. 264-273.

Divakaran, S., Velasco, M., 1999. Effect of proteolytic enzyme addition to a practical feed on growth of the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone). Aquaculture Research 30 (5), 335-339.

Ehrarhdt, N.E y Ramírez, P. 1982. Evaluación de los recursos demersales accesibles y redes de arrastre de fondo de la península de B. C. México. INP. Serie Científica 23: 10-46.

Ezquerra, J.M., Garcia-Carreño, F.L., Haard, N.F., 1997b. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp Penaeus Íannamei.. J. Food Biochem. 21, 401–419.

FAO. 2006. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006. Roma, FAO. 219p.

Fernandez, I., Olivia, M., Carrillo, O. and Van Wormhoudt, A. 1997. Digestive enzyme activities of *Penaeus notalis* during reproduction and moulting cycle. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology. 118A: 1267-1271.

Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Negas, I., Venou, B., 2005. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquac. Res. 36, 1243-1251.

Galgani, F. 1985. Etude des Proteases Digestives de Crevettes Peneides (Crustacea Decapoda).

Galgani, M.L., Benyamin, Y., Ceccaldi, H.J., 1984. Identification of digestive proteinases of *Penaeus kerathurus* (Forskal Forskal): a comparison with *Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol*., Part B 78, 355–361.

Galgani F., Andral B. 1998. Methods for evaluating debris on the deep sea floor. OCEANS'98/IEEE/OEC Conference, Nice 28/09-01/10/983, 1512–1521.

Galicia A. 2001. Determinación del valor nutricio de un hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Garcia-Carreño, F.L., 1992a. The digestive proteases of langostilla Pleuroncodes planipes, decapoda.: their partial characterization, and the effect of feed on their composition. Comp. Biochem. Physiol. 103B, 575–578.

Garcia-Carreño, F.L., Navarrete del Toro, A., Ezquerra, J.M. 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro: I. Effect of protease inhibitors in protein ingredients. J. Mar. Biotechnol. 5, 36–40.

Gates, B. and Travis, J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. Biochemistry, 8 (11): 44834489.

Gates, B. and Travis, J. 1973. Purification and characterization of carboxypeptidases A & B from the white shrimp *Penaeus setiferus*. Biochemistry, 12 (10): 18671874.

German, J. B., Bauman, D. E., Burrin, D. G., Failla, M. J., Freake, H. C., King, J. C., Gillies, S., Faha, P. D. 2003. Nutrigenomics: The rubicon of Molecular nutrition. Journal of the American Dietetic Association 103:550-555.

Gibson, R. and Barker, P. 1979. The decapods hepatopancreas. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17:197-204.

Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology 30 503–512.

Goytortúa –Bores, E. 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento en el camarón

blanco (*L. vannamei*). Tesis de ingeniería en alimentos. UASLP. San Luis Potosí, S.L.P.México. 112p.

Goytortúa –Bores, E. 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Colima. Colima, México.

Goytortúa-Bores, E., R. Civera-Cerecedo*, S. Rocha-Meza, and A. Green-Yee. 2006. Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. Aquaculture. Vol 256 (1-4), 414-422

Gutiérrez-Leyva R. 2003. Calidad nutricional de dos productos a base de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína o aditivo alimentario en alimentos balanceados para juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura en Biología Marina, UABCS. La Paz, B.C.S. México, 2003

Harland, J. I. 2005. Nutrition and genetics.Mapping individual health. ILSI Europe Concise Monograph Series, 1-24.

Jory, D.E, Cabrera, T.R, Dugger, D. M, Fegan, D., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Jackson, C.J, McIntosh, R.P. & Castañeda, J. 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives, pp. 104-152. In: C.L. Browdy & D.E. Jory, eds, The New Wave, Proceedings of Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

Kanzawa, A. 1984. Nutrition of penaeid prawns and shrimps. Proceedings First Int. Conf. Culture Penaeid Prawns, Philippines, pp: 123-130

Kaput, J. and Rodriguez, R. L. 2004. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. Physiol Genomics. 16: 166-177.

Karoonuthaisiri, N., Charlermroj, R., Uawisetwathana, U., Luxananil, P., Kirtikara, K., Gajanandana, O., 2009. Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens. Biosens. Bioelectron. 24, 1641–1648.

Kitabayashi, K., Kurata, H., Shudo, K., Nakamura, K., and Ishikawa, S. 1971. Studies on formula feed for kuruma prawn: I. On the relationship among glucosamine, phosphorus and calcium. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. 65:91-107.

Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D., van Wormhoudt, A. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. Int. J. *Biochem. Cell Biol*. 28, 551–563.

Kussmann, M., Affolter, M., Fay, L. B. 2005. Proteomics in nutrition and health Comb. Chem. Heigh T. Scr. 8:679-696.

Martínez Cordova, L. 1999. Cultivo de Camarones Peneidos, Principios y Prácticas. A.G.T. Editor, S.A. México, 11800 D. F. 283 pp.

Muramatsu, T. and Morita, T. 1981. Anionic trypsin-liké enzymes from the crab *Enriocheir japonicus* De Haan, active in more acidic media. Comp. Biochem. Physiol. 70 B:527533.

Mclean, E. and Craig, S. R. 2007. Nutrigenomics in aquaculture research: a key in the "Aquanomic" revolution. Aquaculture technical article. http://en.enormix.com/MA-aquaculture/articles/p90.htm

Morales Díaz, MO. 2004. Cultivo de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, Aldea el Salitrillo, Municipio de Pasaco, depto. de Jutiapa, Guatemala. Guatemala, USAC. 72 p.

New, M.B., 1987. Feed and feeding of fish and shrimp. A manual of the preparation of compound feeds for shrimp and fish in aquaculture. FAO., Rome, 275 p.

Paoloni-Giacobibo, A., Grimble, R., Richard, C. 2003. Genetics and Nutrition. Clinical Nutrition 5: 429-435.

Peres, A., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrachus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 19, 145–152.

Pérez-Farfante, I & Kensley, B. 1997. Keys and diagnoses for the families and genera. Penaeoid and sengestoid shrimps and prawns of the world. Mémoires du museum national d histoire naturelle. pp 233.

Plous, C. V., 2007. Microarreglos de ADN y sus aplicaciones en investigaciones biomédicas. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 38 No. 2. Cuba,

Lau, F. C., Bagchi, M.,Sen, C., Roy, S., Bagchi, D. 2008. Nutrigenomic Analysis of Diet-Gene Interactions in Functional Supplements for Weight Management. Current Genomics 9: 239-251.

Laveus P., G. Merchie y P. Sorgeloos. 1998. Critical reviews of the larval fish and crustacean feeding methods with ascorbic acid enriched diets: effects on fish and shrimp growth, stress and dissease resistance. World Aquaculture 98, Las Vegas, U.S.

Lee, P.; Blake, N. and Rodrick, G. 1980. A quantitative analysis of digestive enzymes for the freshwater prawn *Macrobrachium rosembergii*. Proc. World Maric. Soc, 11; 392402.

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

Livak, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J.,Guisti W., Deetz, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. 4:357–62.

Lhoste, E.F., Fislewicz, M., Gueugneau, A.M., Corring, T., 1994. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: effect of the nature of protein and rat strain on enzyme activities and messenger RNA levels. J. Nutr. Biochem. 5,84–93.

Reed, G. 1993. Introduction. In: Nagodawithana, T. and Reed, G. Enzymes in Food Processing. AcademicPress. San Diego. 1-5 pp.

Rodríguez, S. G. 1999. Generalidades. In: Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Prado, B.R., Huerta, O.S., Rodríguez, S.G y Saucedo, C.G. Editores. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 367pp.

Rosenberry, B. 2004. World Shrimp Farming 2004. An annual report. Shrimp News International, EUA, 276 pp.

Robertson, E. F., Dannelly, K., Malloy, P. J. and Reeves, H. C. 1987. Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. Anal. Biochem. 167, 290-294.

Rungrassamee W., Maibunkaew S., Karoonuthaisiri N., Jiravanichpaisal P. 2013. Application of bacterial lipopolysaccharide to improve survival of the black tiger shrimp after Vibrio harveyi exposure. Developmental and Comparative Immunology 41: 257–262p.

Samain, J. F., Moal, J., Daniel, J. Y., Le Coz, J. R., & Jezequel, M., 1980. The digestive enzymes amylase and trypsin, in relation to development in culturing Artemia salina : Effect of food conditions. Proceedings of the international symposium on the brine shrimp Artemia salina. In: Artemia Symposium. Ed. by G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels & E. Jaspers. Universa Press, Wetteren, 2 (in press).

Scheel, J., Von Brevern, M. C., Horlein, A., Fischer, A., Schneider, A., Bach, A. 2002. Yellow pages to the transcriptome. Pharmacogenomics 3:791-807.

Sherlock, G., 2000. Analysis of large-scale gene expression data.Curr.Opin.Immunol., 12, 201–205.

Spinelli J. and Mahnken C. 1978. Carotenoid deposition in pen-reared salmonids fed diets containing oil extracts of red crab (*Pleuroncodes Planipes*). Aquaqulture. 13: 213- 223.

Spinelli J, Lehman L, Wieg D. 1974. Composition, processing and utilization of red crab (Pleronodes planipes) as an aquaculture feed ingredient. J Fish Res Board Can. 1974; 31: 1025–1030.

Stingley, S. 2000 Global analysis of herpes simplex virus type 1 transcription using an oligonucleotide-based DNA microarray. J. Virol. 74, 9916–9927,
Swick, R. A. 2002. Soybean meal quality: assessing the characteristics of a major aquatic feed ingredient. *Global* Aquaculture Adovocate 5: 46-49.

Tacon, A. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Programa Cooperativo Gubernamental. GCP/RLA/102/ITA. Proyecto Aquila II. Documento de Campo No. 4, FAO-Italia.

Tacon A.G.J. 1990. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Italia.572p.
Tacon, A y Akiyama, D. M 1997. Feeds ingredients. Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture Society 6: 411-472.

Tacon, A. 1995. The potential for Fishmeal subsitution in aquafeeds.Infofish International 3: 29-34.

Terrazas-Fierro M., Civera-Cerecedo R., Ibarra-Martínez L., Goytortúa-Bores E., Herrera-Andrade M. and Reyes-Becerra A. 2010. Apparent digestibility of dry matter, protein, and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 308 (2010) 166–173 (F.I. 1.925). ISSN: 0044-8486.

Terrazas M., Civera R., Ibarra L. y Goytortúa E. 2010. Coeficientes de utilización digestiva aparente de materia seca, proteína y aminoácidos esenciales de ingredientes terrestres para el camarón del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). International Journal of Tropical Biology. Vol. 58 (4): 1561-1576.

Trellu, J. and Ceccaldi, H. J. 1977. Variation des activités enzymatiques de l'hépatopancréas et du muscle de Palaemon serratus au cours du cicle d'intermue. C. R. Soc. Biol., 171 (1):115121.

Teichert-Coddington D. 1994. La calidad del agua y su manejo en estanques de camarón. En: Zendejas-Hernández J (ed) Memorias del Seminario Internacional de Camaronicultura, Camaron 94´. Mazatlán, Sinaloa, México, pp. 12-29.

Van Olst, J. C., Ford, R. F., Carlberg, J.M. y Dorbamd, W.R. 1976. Use of thermal effluent in culturing the American lobster. Power plant Heat Waste Utilization in Aquaculture-Workshop I. 1976. 71-100pp.

Van Hormhoudt, A. 1980. Regulation d' activité de l' α-amylase á différentes températures d'adaptation et en fonction de l'ablation des pédoncules occularies et du stade de muechez Palaemon serratus. Biochem. Syst. Ecol. 8, 193-203.

Van Hormhoudt, A., Danval, A., Plaire-Goux, S., Le Moullac, G., Sellos, D., 1995. Chymiotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda). Experentia 51, 159-163.

Van Hormhoudt, A. and Sellos, D. 1996. Cloning and sequencing Analysis of three amylase cDNAs in the shrimp Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda) Evolutio. Aspect. J. Mol. Evol. 42: 543 -551.

Vega-Villasante, F., Béquer-Zúñiga, U.; Hernández, N.; Nolasco-Soria, H.; Carrillo-Franés, O.; 2004. Langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) como alimento funcional en el crecimiento, supervivencia y composición corporal de larvas de camarón (*Litopenaeus schmitti*) III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura.

Vega-Villasante, F., H. Nolasco and R. Civera. 1993. The digestive enzymes of pacific brown shrimp *Penaeus californiensis:* I. Properties of amylase activity in the digestive tract. Comparative Biochemistry and Physiology 160B, 547-550.

Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Fallarero, A. and Carrillo-Franés, O. 2002.Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Ghalatehidae) as a potential food aditive, considerations for a new fishery along the México Pacific coast. Hidrobiológica 12 (2): 119-128.

Vega-Villasante, F. 2003. La langostilla roja *Pleuroncodes planipes* (Crustacea, Decapoda) como alimento funcional bajo la forma de aditivo alimentario en dietas para camarón. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana. Cuba, 2003.

Valasek, M. A. and J. J. Repa 2005. "The power of real-time PCR." Adv Physiol Educ29(3): 151-159.

Vijayan, K. K.,Sunilkumar*Mohamed, K. Ydiwan, A. D. 1997. Studies on moult staging, moulting duration and moulting behaviour in indian shrimp *Penaeus indicus* Milne Edwards (Decapoda: Pemaeidae). J. Aquacul. Trop. 12(1):53-64.

Villarreal, H. 1995. Utilización de la langostilla en la acuacultura. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Avances de nutrición Acuícola. La Paz, B. C. S. México, pp. 179-191.

Villarreal H. Civera-Cerecedo R. & Hernández-Llamas A. 2006. Effect of partial and total substitution of shrimp meal, fish meal and soy meal with red crab meal *Pleuroncodes planipes* (Stimpson) on the growth of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research, 37, 293-298.

Wang, Y. B. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of shrimp *Penaeus vannamei*. Food quality and safety department of ZheijiangGongshang University. China. 6pp.

Whitaker, J.R. 1994. Principles of enzymalogy for the food science. Macerl Dekker Inc. N.Y. 27p.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M. h., Takami, G. A., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. R., Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus spp*. bacteria used as probiótics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaqulture 252, 516-524.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp Biochem Phys C 130, 477-487.

ANEXOS

ANEXO 1

11.1 Extracción de ARN total

Método del reactivo de TRIZOL™ (Invitrogen)

Material:

Cloroformo	0.2 mL/mL de TRIZOL
Alcoholisopropílico (n-propanol)	0.5 mL/mL de TRIZOL
Etanol a 75% (con agua DEPC)	1 mL/mL de TRIZOL

Agua DEPC (0.1%)

Método:

1.- Homogenización

Antes de realizar la extracción, poner el reactivo de Trizol a temperatura ambiente. La homogenización de la muestra se hace en 10 % vol. / vol. de la muestra, es decir 1 mL de Trizol por 50-100 mg de tejido.

2.- Fase de separación

a. Incubar el homogenado 5 min a temperatura ambiente.

b. Agregar cloroformo (0.2 mL/mL de Trizol)

c. Agitar manualmente durante 15 seg.

d. Incubar 2-3 min a temperatura ambiente

e. Centrifugar 12000*g* por 15 min.

f. Se obtienen 3 fases y se recupera la superior acuosa (ARN), que deberá representar el 60% del volumen de Trizol utilizado para la homogenización. Cuidar de no contaminar con la fase intermedia (proteica y debris celular).

3.- Precipitación de ARN

a. Transferir la fase acuosa en un tubo limpio

b. Precipitar el ARN con alcohol isopropílico (0.5 mL/mL de Trizol)

c. Incubar 10 min a temperatura ambiente y agitar manualmente

d. Centrifugar a 12000*g* 10 min a 4°C

e. El ARN precipitado debe verse en el fondo del tubo de forma translucida.

4.- Lavado de ARN

a. Eliminar el sobrenadante

b. Lavar el sedimento con alcohol al 75% con agua DEPC (1mL/mL de Trizol)

c. Agitar en vortex, a la mitad de su intensidad máxima

d. Centrifugar a 7500*g* por 5 min a 4°C

5. Resuspensión

a. Secar el tubo con gas nitrógeno o en una campana de extracción por 5 min (no secar completamente ya que el ARN se adhiere a los plásticos)

b. Resuspender el ARN con 40-50 µl de agua DEPC (realizar tratamiento con ADN I) o seguir la siguiente metodología:

1.-Calentar 10 min a 55-60°C

2.- Cuantificar y verificar pureza al espectrofotómetro con el cociente DO260/280, que no deberá ser inferior a 1.6

3.- Alicuotar 20-30 µl y congelar

4.- Opcional para almacenar por largos períodos de tiempo: precipitar el sobrenadante con:

0.1 vol. de acetato de potasio o sodio (2M pH

2 vol. de etanol

5.- Congelar a -80°C

6.- Con una de esas alícuotas, proceder a la obtención de cDNA o dar tratamiento con DNAsa I

ANEXO 2

11.2 Hibridación de microarreglo heterólogo.

Pretratamiento del microarreglo

Para prehidratar la laminilla se expuso el lado impreso al vapor de agua a 50°C durante 10 segundos, se volteó para secar y volvió a exponer al vapor 3 veces más, se fijo con dos ciclos de luz U.UV.0.12J x cm^2, y enseguida se lavó con SDS 0.1% durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la laminilla dos veces con agua desionizada durante 1 minuto y se pasó inmediatamente a la solución de prehibridación (SSC 5x, SDS al 0.1%, BSA al 1%).Se incubó en agitación suave por una hora a 42°C.

Al término de la incubación se lavó 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y seco por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos.

Hibridización

Para preparar la mezcla de hibridación se tomaron 15 µl (~ 0.1 U.D.O) de la muestra de cDNA marcada con alexa 555 y 15 µl (~ 0.1 U.D.O) de la muestra de cDNA marcada con alexa 647 por separado y secaron en el "Speed-back". Amabas sondas fueron resuspendidas con 45.5µl de TE y 24.5µl de solución de hibridación UniHyb™ (ArrayIt) preincubada a 65°C. Ambas soluciones se mezclaron dando un volumen final de 70 µl. Posteriormente la mezcla fue desnaturalizada a 94°C por 5 minutos y finalmente a 65°C por 30 segundos.

La mezcla fue aplicada suavemente sobre el area del microarreglo y la superficie fue cubierta con un cubreobjetos (HybriSlip™ Scheleicher&Schuell). Se colocó la laminilla en la cámara de hibridación (Corning 2551) y se incubo a 42°C toda la noche.

Lavados

Se realizaron 3 lavados de 2 minutos cada uno, el primero se hizo con 50ml de SSC 1X-SDS AL 0.05% y los restantes se hicieron con 50 ml SSC 0.06x. La laminilla fue secada por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos y se procedió a la lectura en el lector de microarreglos Genepix 4100 A.

ANEXO 3

Lista de genes sobre-expresados y reprimidos

ID de cada gen obtenido sobreexpresado y reprimido (up y down) en la comparación realizada entre los genes de intestino y hepatopáncreas de los camarones alimentados con harina de langostilla tuvieron en común 30 genes sobre-expresados y 10 genes reprimidos.

UP	DOWN
CG10158	CG1234
CG10244	CG12770
CG10588	CG15859
CG12233	CG30150
CG12244	CG3454
CG12517	CG4800
CG12723	CG6106
CG13814	CG7211
CG1401	CG8392
CG31960	CG8597
CG32548	
CG32568	
CG5577	
CG6054	
CG6155	
CG6171	
CG6175	
CG6211	
CG6213	
CG6246	
CG6287	
CG6302	
CG6303	
CG6379	
CG6380	
CG6422	
CG6424	
CG6523	
CG9506	
CG9819	

ANEXO 4

11.4 Gráficos obtenidos en el análisis de qPCR.

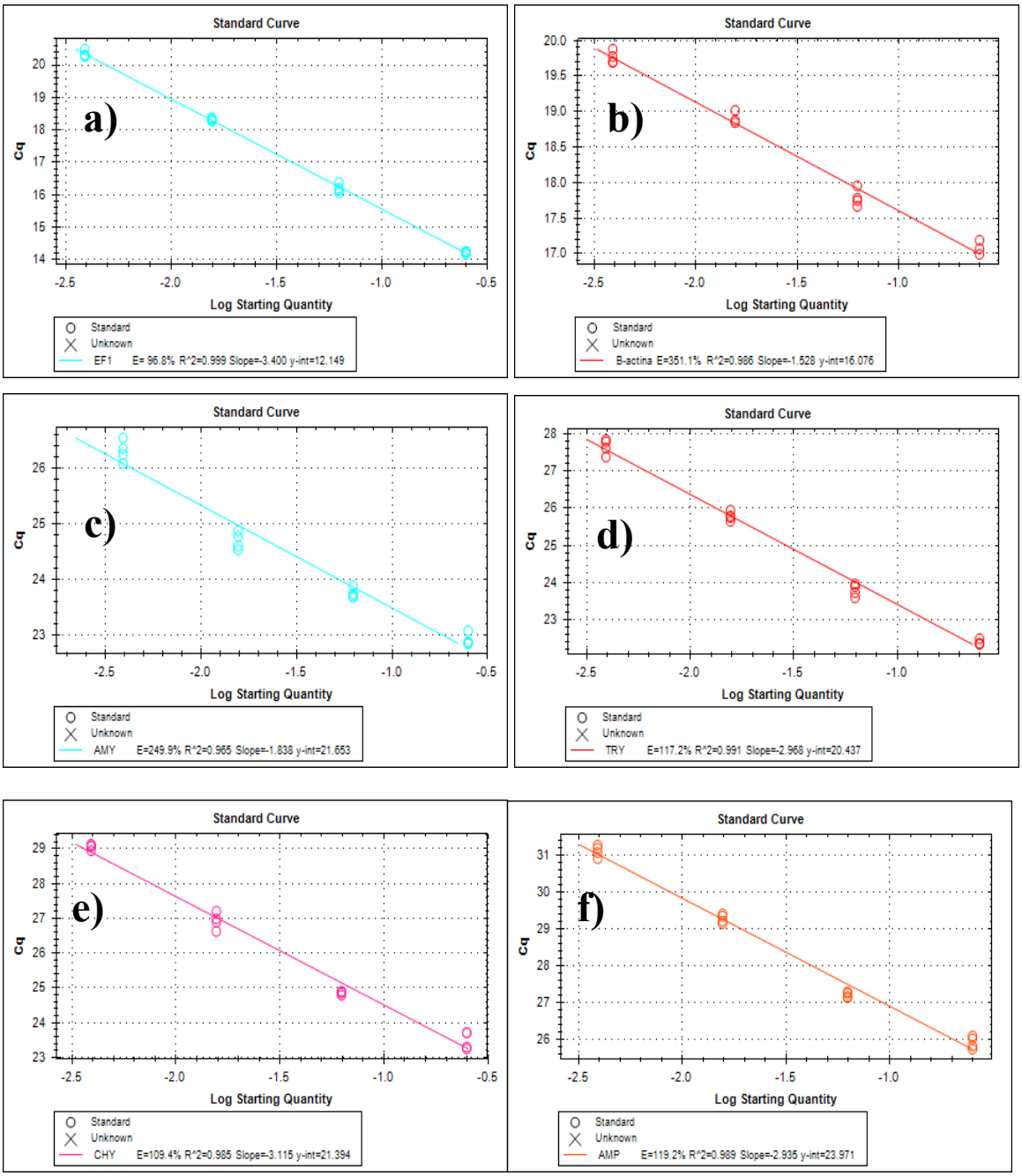


Figura 1. Amplificación por qPCR de las diluciones seriales de cDNA para evaluar la eficiencia de amplificación a cada de uno de los genes. Curva estándar de a) Ef1-α b) β-actina c) amilasa, d) tripsina, e) aminopeptidasa y f) quimotripsina. Cq versus el logaritmo de la concentración de ADN.

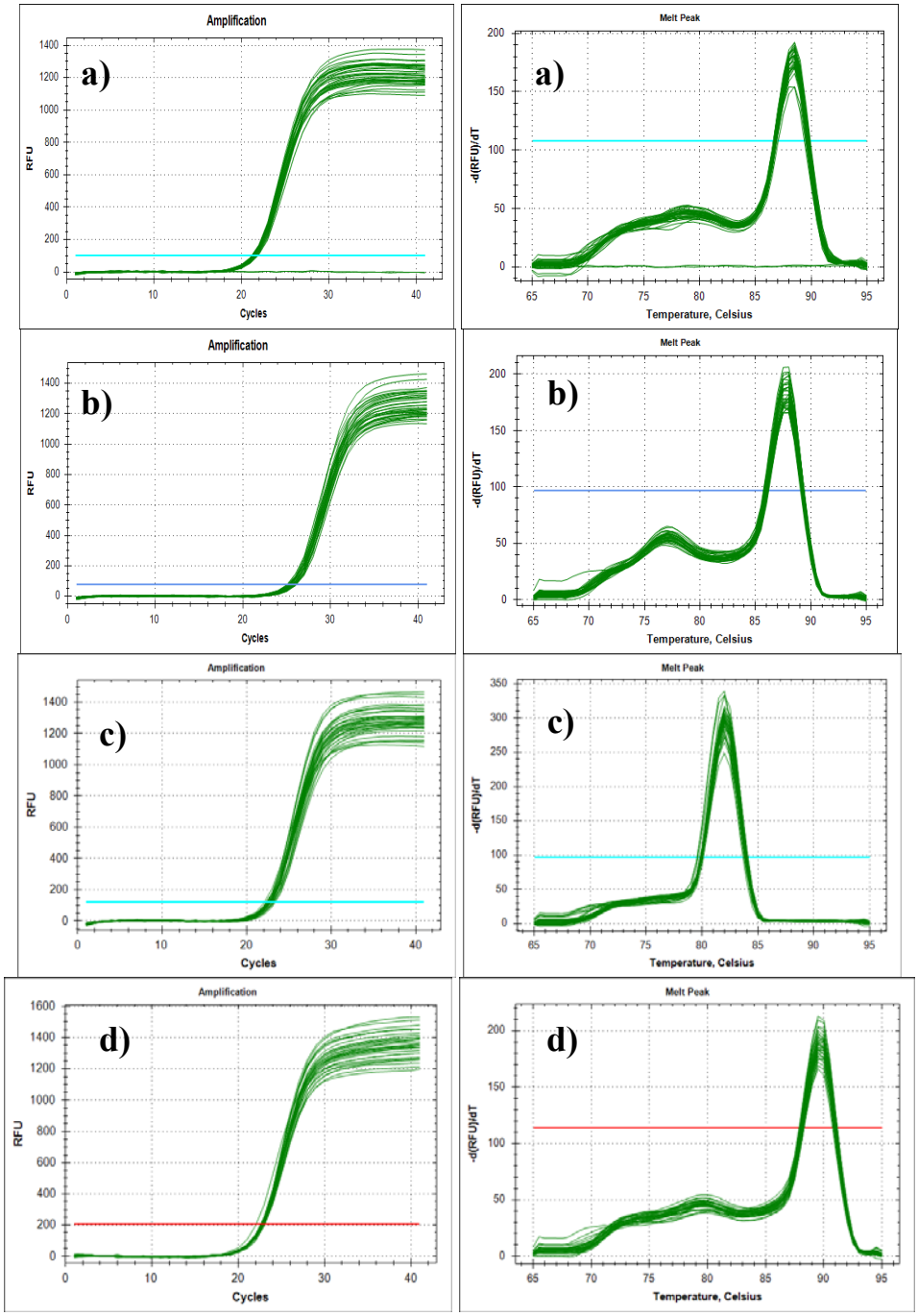


Figura 2. Amplificación por qPCR de las muestras para cada uno de los genes, izquierda RFU versus el número de ciclos y derecha curvas de disociación de los cuatro genes. a) amilasa b) tripsina c) aminopeptidasa y d) quimotripsina. Es evidente que el punto de desnaturalización de la hebra de ADN en la curva de disociación empieza después de los 80°C para los cuatro genes y también es posible observar que los primers utilizados no formaron ningún tipo de dímeros o estructuras secundarias.