



Programa de Estudios de Posgrado

**ADAPTACIONES FISIOLÓGICAS DURANTE EL PROCESO DE
CRECIMIENTO COMPENSATORIO DEL CAMARÓN BLANCO,
Penaeus vannamei.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

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

Presenta:

Diana Ramona Barajas Sandoval

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2024.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 27 del Mes de Noviembre del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Adaptaciones fisiológicas durante el proceso de crecimiento compensatorio del camarón blanco, *Penaeus vannamei*"


Presentada por la alumna:

Diana Ramona Barajas Sandoval

Aspirante al Grado de DOCTOR 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 **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov
Co-Tutor



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Directora de Tesis



Dra. Teresa Sicard González
Co-Tutora



Dra. Leticia Arena Ortiz
Co-Tutora



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



La Paz, Baja California Sur, a 26 de Nov de 2024.

Los miembros del comité de tesis la estudiante Diana Ramona Barajas Sandoval del Programa de Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas y bibliografía
Excluir coincidencias inferiores a 9 palabras
- Porcentajes de similitud: 14%
Se muestra captura de pantalla

		Citas excluidas	14%
		Bibliografía incluida	SIMILAR
Resumen de Coincidencias			
1	Internet 345 palabras hdl.handle.net		1%
2	Internet 243 palabras Copiado el 12-Ago-2019 cibnor.repositorioinstitucional.mx		1%
3	Crossref 222 palabras Diana R. Barajas-Sandoval, Cristina Escobedo-Fregoso, Eduardo Quiroz-Guzman, Daríel Tovar-Ramírez et al. "Effect		1%
4	Internet 154 palabras tdx.cat		1%
5	Internet 131 palabras Copiado el 25-Sep-2022 bibliotecadigital.exactas.uba.ar		<1%
6	Internet 124 palabras Copiado el 22-Jul-2024 doczz.es		<1%
7	Internet 117 palabras Copiado el 25-Ene-2024 1library.co		<1%

Firmas del Comité

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov

Dra. María Teresa Sicard González

Dra. María Leticia Arena Ortiz

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor de Tesis

Dra. María Teresa Sicard González
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. María Leticia Arena Ortiz
Universidad Nacional Autónoma de México
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dra. María Teresa Sicard González
Dra. María Leticia Arena Ortiz

Jurado de Examen

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dra. María Teresa Sicard González
Dra. María Leticia Arena Ortiz

Suplentes

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dra. Regina Elizondo González

Resumen


El camarón blanco, *Penaeus vannamei*, es la especie más cultivada a nivel mundial, sin embargo, durante su cultivo algunas condiciones como disponibilidad de alimento, temperatura y alta densidad, pueden llegar a ser estresantes y alterar su tasa de crecimiento. Se ha observado que cuando las condiciones óptimas de cultivo son restablecidas después del periodo de estrés, los camarones pueden experimentar un crecimiento acelerado conocido como crecimiento compensatorio (CC). Aunque este mecanismo ha sido reportado en camarones, el conocimiento sobre la plasticidad fisiológica que ocurre durante este proceso es limitado. El objetivo de este estudio fue evaluar a nivel fisiológico y genómico el efecto del ayuno, temperatura y densidad de cultivo sobre la capacidad de respuesta de crecimiento compensatorio de *P. vannamei*. Para ello, se realizaron tres bioensayos independientes en los que se evaluó el efecto de cada estresor con diferentes grados de severidad y duración con relación a una condición control. Se realizaron biometrías semanales durante los periodos de estrés y después de que las condiciones óptimas se restablecieron. Se obtuvieron muestras de músculo, hemolinfa y hepatopáncreas para determinar el flujo de combustibles y reservas energéticas, indicadores de estrés oxidativo y actividad enzimática digestiva. Así mismo, se emplearon técnicas moleculares para identificar el nivel de metilación global del ADN y la expresión de genes asociados al crecimiento compensatorio. Los resultados demuestran que *P. vannamei* es capaz de compensar por completo su crecimiento después de ser expuesto a periodos cortos de ayuno a diferentes temperaturas, hipotermia y densidad de cultivo elevada. A nivel digestivo se observó un incremento en la actividad de enzimas proteolíticas durante el estrés por alta densidad de cultivo y por efecto de la hipertermia e hipotermia prolongada; mientras que la actividad lipasa se incrementó durante el CC inducido por la densidad de cultivo y el estrés térmico de corta duración. La actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, fue alterada por efecto del estrés térmico prolongado y la alta densidad. La movilización de las reservas energéticas entre los tejidos evaluados fue dependiente de la duración y tipo de estresor, sin embargo, durante el estrés inducido por alta densidad de cultivo, se observó mayor contenido de ATP en el músculo del camarón asociado a una mayor utilización de triglicéridos presentes en la hemolinfa. Se identificaron 862 genes expresados diferencialmente por efecto del ayuno, 544 por la hipotermia y 1138 por la densidad de cultivo. Esta última condición también disminuyó significativamente la metilación global del ADN, dando paso a investigaciones más profundas sobre los cambios epigenéticos asociados a las variaciones ambientales en el camarón blanco. La capacidad de respuesta de crecimiento compensatorio a nivel fisiológico y genómico en el camarón blanco *Penaeus vannamei*, es dependiente de la duración del periodo de estrés y tipo de estresor, sin embargo, presenta una amplia plasticidad fisiológica que resalta la posibilidad de implementar la inducción del crecimiento compensatorio como estrategia para lograr mejoras en el cultivo de esta especie.

Palabras clave: *Penaeus vannamei*, estrés, crecimiento compensatorio, plasticidad fisiológica, expresión génica.

ORCID: 0000-0002-0280-1210.

Vo.Bo.


Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-director de tesis


Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-directora de tesis

Summary

The white shrimp, *Penaeus vannamei*, is the most widely farmed species worldwide. However, during its cultivation, certain conditions such as food availability, temperature, and high density can become stressful and disrupt its growth rate. It has been observed that when optimal cultivation conditions are restored after a stress period, shrimp can experience accelerated growth known as compensatory growth (CG). Although this mechanism has been reported in shrimp, knowledge about the physiological plasticity occurring during this process is limited. The objective of this study was to evaluate, at physiological and genomic levels, the effects of fasting, temperature, and culture density on the compensatory growth response of *P. vannamei*. Three independent bioassays were conducted to assess the impact of each stressor at different levels of severity and duration in comparison to a control condition. Weekly biometrics were performed during stress periods and after optimal conditions were restored. Samples of muscle, hemolymph, and hepatopancreas were collected to determine fuel flow and energy reserves, indicators of oxidative stress, and digestive enzyme activity. Molecular techniques were also used to identify the level of global DNA methylation, and the expression of genes associated with compensatory growth. The results demonstrate that *P. vannamei* can fully compensate for its growth after being exposed to short periods of fasting at different temperatures, hypothermia, and high culture density. At the digestive level, an increase in proteolytic enzyme activity was observed during stress from high culture density and prolonged hyperthermia and hypothermia, while lipase activity increased during CG induced by culture density and short-term thermal stress. The activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase, was altered by prolonged thermal stress and high density. The mobilization of energy reserves among the evaluated tissues was dependent on the duration and type of stressor; however, during stress induced by high culture density, a higher ATP content was observed in the shrimp muscle, associated with increased utilization of triglycerides present in the hemolymph. A total of 862 differentially expressed genes were identified due to fasting, 544 due to hypothermia, and 1138 due to culture density. The latter condition also significantly decreased global DNA methylation, highlighting the need for further research on epigenetic changes associated with environmental variations in white shrimp. The compensatory growth response at physiological and genomic levels in the white shrimp *Penaeus vannamei* is dependent on the duration of the stress period and the type of stressor; however, it exhibits broad physiological plasticity that highlights the potential to implement the induction of compensatory growth as a strategy for improving the cultivation of this species.

Keywords: *Penaeus vannamei*, stress, compensatory growth, physiological plasticity, gene expression.

ORCID: 0000-0002-0280-1210.



Vo.Bo.

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-director de tesis



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-directora de tesis

Dedicatoria

A mis padres, María Elena y Diego†, por todo el apoyo y amor recibido, porque cada sacrificio que hicieron y cada lección que me mostraron moldearon la persona que soy. Gracias mamá por enseñarme que los momentos difíciles también pueden enfrentarse con entereza y buena cara. Gracias papá por enseñarme que con perseverancia uno puede lograr lo que se propone en la vida...tus pasos seguirán en nuestros corazones hasta volverte a ver...besos hasta el cielo. Los amo infinitamente.

A mi amado esposo y mis adorados hijos, ustedes son mi razón de ser, mi mayor motivación y mi mayor alegría. Gracias por recorrer este camino a mi lado, por estar conmigo en los momentos buenos y los que no lo fueron tanto, por ser mi apoyo incondicional y por llenar mi vida de amor. Me siento profundamente dichosa por la hermosa familia que somos. Los amo eternamente con el corazón.

A mis hermanos, por su apoyo constante y por estar siempre a mi lado sin importar las circunstancias. Sin duda alguna el lazo que compartimos trasciende cualquier distancia. Los amo para siempre.

*La vida no tiene fecha ni hora,
Ni en los años se mide la victoria,
Quien sueña con fuerza y no demora,
Alcanza la cima, triunfa en su historia.
D.R.B.S.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca de doctorado otorgada (número 331969).

Al proyecto #A1-S-38853 titulado “Plasticidad metabólica y crecimiento compensatorio en camarón *Litopenaeus vannamei*”, financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT, Convocatoria de Investigación Científica Básica 2017-2018, por facilitar los recursos para la realización del presente estudio.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos y a la Academia de Acuicultura, por las instalaciones proporcionadas para el desarrollo del presente estudio y la atención recibida durante estos 4 años.

A mis co-directores de tesis, Dr. Alberto Peña Rodríguez y Dra. Cristina Escobedo Fregoso, por su asesoramiento en cada etapa, por su compromiso y dedicación. Enfrenté grandes retos y estoy agradecida por los grandes aprendizajes que me ofrecieron. Gracias por las pláticas, los convivios y las risas. Gracias por todo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov, Dra. María Teresa Sicard González y Dra. María Leticia Arena Ortiz, por sus invaluable aportaciones y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Laboratorio de Genómica y Bioinformática, al Dr. Ricardo Vázquez Juárez y a la M. en C. Gabriela Mendoza Carrión, por su disponibilidad durante mi estancia en el laboratorio y por el apoyo recibido para continuar creciendo académicamente. Gaby, gracias por las porras en los momentos difíciles, por las pláticas, las risas y por tu amistad.

Al Laboratorio de Fisiología Animal Comparada y Genómica Funcional, al Dr. Dariel Tovar Ramírez por permitirme realizar una estancia en su laboratorio, y a la Biól. Patricia Hinojosa Baltazar† por recibirme siempre con una gran sonrisa...te recordaré por siempre Paty.

Al Laboratorio de Metabolismo Energético, a la Dra. Rosa Linda Salgado García por la ayuda recibida para llevar a cabo mis análisis. Gracias Rosy por tu dedicación y por los tips para conservar mis huellas digitales durante el procesamiento de las muestras:D.

Al Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola, a la M. en C. Sandra de la Paz Reyes y al Biól. Gabriel Robles Villegas por su disponibilidad durante la realización de los bioensayos.

Al Laboratorio Bioquímica Fisiológica, al M. en C. Roberto Hernández Herrera y la M. en C. Jessica Guadalupe Elías Castelo por su apoyo y guía para llevar a cabo mis análisis en su laboratorio.

Al Laboratorio de Análisis Químico Proximal, a la Geól. Sindi Areli Juan Antúnez por su apoyo técnico para complementar el análisis de las dietas.

Al Laboratorio de Larvas Gran Mar S.A. de C.V. y a la empresa Blue Genetics, por facilitar las larvas de camarón usadas en el presente estudio.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Carlos, Esther, Bernardo, Irais, Laura, Eduardo, Clara, por las pláticas, las risas, la buena compañía, y todas las reuniones. Gracias por siempre estar.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Abreviaturas	xii
Glosario	xiii
1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades y cultivo de <i>Penaeus vannamei</i>	2
2.2 Respuesta fisiológica en camarón asociada a estresores ambientales	3
2.3 Estrés temporal y crecimiento compensatorio	7
2.4 Expresión diferencial de genes asociados con alteraciones ambientales	13
2.5 Cambios epigenéticos causados por estresores ambientales	14
3.JUSTIFICACIÓN	15
4.HIPÓTESIS	16
5.OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos particulares	17
6.MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Origen de los organismos experimentales	18
6.2 Determinación del crecimiento compensatorio en camarón <i>Penaeus vannamei</i> inducido por estresores temporales	18
6.2.1 Bioensayo 1: Estrés temporal inducido por ayuno y temperatura	18
6.2.2 Bioensayo 2: Variación térmica como estresor temporal	19
6.2.3 Bioensayo 3: Alta densidad de cultivo como inductor de crecimiento compensatorio	20
6.2.4 Control de parámetros fisicoquímicos	21
6.2.5 Parámetros zootécnicos	21
6.2.6 Obtención de muestras	21
6.3 Respuesta fisiológica de <i>P. vannamei</i> inducida por estresores temporales	23
6.3.1 Determinación de actividad de enzimas antioxidantes	23
6.3.2 Determinación de actividad enzimática digestiva	25
6.3.3 Determinación de metabolitos en tejidos de reserva	25
6.3.4 Estado bioenergético	27
6.3.5 Metilación global del ADN	29
6.3.6 Análisis estadísticos	30
6.4 Identificación de genes asociados al crecimiento compensatorio del camarón blanco	31
6.4.1 Extracción de ARN	31
6.4.2 Análisis bioinformático	32
6.4.3 Ontología de genes durante el CC inducido por distintos estresores	32

6.4.4 Validación de genes expresados diferencialmente mediante qPCR.....	33
7.RESULTADOS.....	35
7.1 Bioensayo 1: Efecto del estrés temporal en <i>P. vannamei</i> inducido por ayuno y temperatura.....	35
7.1.1 Rendimiento productivo y supervivencia	35
7.1.2 Expresión de genes durante el crecimiento compensatorio y punto de no retorno del camarón <i>P. vannamei</i>	39
7.2 Bioensayo 2: Efecto del estrés temporal en <i>P. vannamei</i> inducido por temperatura.....	51
7.2.1 Rendimiento productivo y supervivencia	51
7.2.2 Respuesta fisiológica en <i>P. vannamei</i> expuesto a estrés térmico temporal	54
7.2.3 Expresión de genes durante el crecimiento compensatorio de <i>P. vannamei</i> inducido por hipotermia	61
7.3 Bioensayo 3: Efecto del estrés temporal en <i>P. vannamei</i> inducido por alta densidad de cultivo	66
7.3.1 Crecimiento y supervivencia de <i>P. vannamei</i> expuesto a alta densidad de cultivo	66
7.3.2 Respuesta fisiológica en <i>P. vannamei</i> inducida por la alta densidad de cultivo.....	67
7.3.3 Expresión de genes en <i>P. vannamei</i> por efecto de la alta densidad de cultivo.....	80
7.4 Genes asociados al crecimiento compensatorio inducido por distintos estresores	84
8.DISCUSIÓN.....	87
9.CONCLUSIONES.....	104
10.LITERATURA CITADA	106
11.ANEXOS	122
Anexo A. Cinética de crecimiento de <i>Penaeus vannamei</i> expuesto a periodos de ayuno y temperatura	122
Anexo B. Selección del gen de referencia.....	123
Anexo C. Porcentaje y términos de genes anotados por cada categoría ontológica durante el bioensayo de estrés térmico	124
Anexo D. Porcentaje y términos de genes anotados por cada categoría ontológica durante el bioensayo de estrés por alta densidad de cultivo.....	127
Anexo E. Términos de genes expresados diferencialmente durante el CC de <i>P. vannamei</i> ...	131
Anexo F. Artículo publicado.- Temperature and fasting effect on compensatory growth and transcriptomic response in the Pacific white shrimp <i>Penaeus vannamei</i>	136
Anexo G. Artículo publicado.- Effect of temporal thermal stress on <i>Penaeus vannamei</i> : Growth performance and physiological plasticity.....	146

Lista de figuras

Figura 1. Tipos de crecimiento compensatorio (líneas verdes) comparados con el peso de organismos no estresados (línea negra).....	8
Figura 2. Representación gráfica de la obtención de muestras para el análisis fisiológico y transcriptómico de cada bioensayo	22
Figura 3. Diagrama de la técnica de ELISA indirecta donde el ADN metilado es adsorbido en la superficie del pozo donde es reconocido por un anticuerpo primario; este último a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario marcado, capaz de generar un producto detectable por espectrofotometría.....	30
Figura 4. Diagrama de procesamiento de secuencias genómicas y análisis bioinformático.....	33
Figura 5. Peso promedio final del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> sometido a distintos periodos de ayuno y temperatura.....	35
Figura 6. Porcentaje de supervivencia de <i>Penaeus vannamei</i> obtenido en tratamientos con diferentes periodos de ayuno y temperatura.....	38
Figura 7. Tasa de crecimiento específico del camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i> a los 7 días de recuperación con alimentación a saciedad después de 3, 7 y 14 días de ayuno a 30°C.	39
Figura 8. Diagrama de Venn que compara genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio y el punto de no retorno.	43
Figura 9. Ontología de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio (naranja) y punto de no retorno (verde) de <i>Penaeus vannamei</i> expuesto a 3 y 14 días de ayuno, respectivamente.	45
Figura 10. Procesos biológicos enriquecidos durante el crecimiento compensatorio de <i>Penaeus vannamei</i> inducido por ayuno temporal.....	47
Figura 11. Procesos biológicos enriquecidos durante el punto de no retorno de <i>Penaeus vannamei</i> inducido por ayuno prolongado.....	48
Figura 12. Nivel de expresión relativa de genes expresados diferencialmente en <i>Penaeus vannamei</i> expuesto a periodos de ayuno a 30°C. A) expresión del gen <i>AGL</i> durante el crecimiento compensatorio (A3) y de los genes B) <i>GPX4</i> , C) <i>nadk</i> y D) <i>Ddb1</i> durante el punto de no retorno (A14).).....	50
Figura 13. Tasa de crecimiento específico (% día ⁻¹) de <i>Penaeus vannamei</i> durante exposición a estrés térmico durante A) 7 días y B) 14 días.....	52
Figura 14. Tasa de crecimiento específico (% día ⁻¹) de <i>Penaeus vannamei</i> entre A) los días 7 al 21 y B) los días 21 al 49 del periodo de recuperación a 28°C posterior al estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días.	53
Figura 15. Actividad superóxido dismutasa en <i>Penaeus vannamei</i> al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días.	54
Figura 16. Actividad catalasa en <i>Penaeus vannamei</i> al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días.	55
Figura 17. Actividad glutatión peroxidasa en <i>Penaeus vannamei</i> al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días.	55

Figura 18. Porcentaje de metilación global en <i>Penaeus vannamei</i> durante la fase de estrés inducido por hipotermia prolongada a 22°C y durante la fase final de recuperación a 28°C.....	61
Figura 19. Términos enriquecidos durante el crecimiento compensatorio de <i>Penaeus vannamei</i> inducido por hipotermia.....	65
Figura 20. Cinética de crecimiento de <i>P. vannamei</i> expuesto a periodos de alta densidad de cultivo (1100 org/m ³) durante 14 (D14) y 21 días (D21) seguidos de un periodo de recuperación con densidad óptima (220 org/m ³) durante 35 y 28 días, respectivamente, comparada con la de organismos cultivados en densidad óptima constante (220 org/m ³).....	66
Figura 21. Actividad superóxido dismutasa en <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.	68
Figura 22. Actividad catalasa en <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.	69
Figura 23. Actividad glutatión peroxidasa en <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.	69
Figura 24. Actividad tripsina en <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.	70
Figura 25. Actividad quimotripsina en <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.	71
Figura 26. Actividad lipasa en <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.	71
Figura 27. Actividad amilasa en <i>Penaeus vannamei</i> a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.....	72
Figura 28. Carga energética adenílica observada en <i>P. vannamei</i> al día 14 de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.	79
Figura 29. Concentración de arginin fosfato en <i>P. vannamei</i> al día 14 de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima.....	79
Figura 30. Porcentaje de metilación global del ADN en <i>Penaeus vannamei</i> durante la fase de estrés inducida por alta densidad de cultivo (1100 org/m ³) y durante la fase final de recuperación con densidad de cultivo óptima (220 org/m ³).	80
Figura 31. Términos enriquecidos durante el crecimiento compensatorio de <i>Penaeus vannamei</i> inducido por alta densidad de cultivo.	83
Figura 32. Diagrama de Venn que compara los genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de <i>P. vannamei</i> inducido por ayuno, hipotermia y alta densidad de cultivo.....	84

Lista de tablas

Tabla 1. Diseño experimental del bioensayo de ayuno y variación de temperatura en camarón...	19
Tabla 2. Diseño experimental del bioensayo de estrés térmico temporal en camarón	20
Tabla 3. Diseño experimental del bioensayo de alta densidad de cultivo en camarón.....	20
Tabla 4. Secuencias, eficiencia de amplificación y concentración de primers para la validación de genes expresados diferencialmente.....	34
Tabla 5. Parámetros zootécnicos observados en <i>Penaeus vannamei</i> expuesto a periodos de ayuno y temperatura.....	37
Tabla 6. Concentración de ARN en muestras de tratamientos sometidos a restricción alimenticia total y grupos control.....	40
Tabla 7. Número de lecturas de las bibliotecas genómicas secuenciadas a partir de muestras de músculo del bioensayo (1) de ayuno/temperatura y porcentaje de alineamiento al genoma de referencia de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	41
Tabla 8. Estadísticas del ensamble de transcritos de las bibliotecas del bioensayo (1) de ayuno/temperatura.	41
Tabla 9. Número de genes expresados diferencialmente con respecto al control.	42
Tabla 10. Rendimiento productivo y supervivencia de <i>Penaeus vannamei</i> expuesto a estrés temporal por hipotermia (B=22°C) e hipertermia (A=32°C) durante 7 y 14 días.....	51
Tabla 11. Actividad específica de enzimas digestivas (U/μg de proteína) en <i>P. vannamei</i> al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de hipotermia a 22°C e hipertermia a 32°C.....	56
Tabla 12. Concentración de compuestos metabólicos en el músculo de <i>Penaeus vannamei</i> a los 49 días, durante la fase de recuperación a 28°C, después de haber sido expuesto a periodos con diferentes temperaturas.....	58
Tabla 13. Concentración de compuestos metabólicos en el hepatopáncreas de <i>Penaeus vannamei</i> a los 49 días, durante la fase de recuperación a 28°C, después de haber sido expuesto a periodos con diferentes temperaturas.....	59
Tabla 14. Concentración de compuestos metabólicos en la hemolinfa de <i>Penaeus vannamei</i> a los 49 días, durante la fase de recuperación a 28°C, después de haber sido expuesto a periodos con diferentes temperaturas.....	60
Tabla 15. Número de lecturas de las bibliotecas genómicas secuenciadas a partir muestras de hepatopáncreas del bioensayo (2) de variación térmica y porcentaje de alineamiento al genoma de referencia de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	62
Tabla 16. Estadísticas del ensamble de transcritos de las librerías del bioensayo (2) de variación térmica.....	62
Tabla 17. Número de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de <i>P. vannamei</i> expuesto a hipotermia (22°C) durante 14 días.....	63
Tabla 18. Rendimiento productivo y supervivencia de <i>Penaeus vannamei</i> a 49 días de cultivo después de la exposición a periodos temporales de alta densidad de cultivo (1100 org/m ³) durante 14 y 21 días de cultivo.....	67
Tabla 19. Concentración de compuestos metabólicos en el músculo de <i>Penaeus vannamei</i> durante y después de la exposición a alta densidad de cultivo (1100 org/m ³), comparados con un grupo control mantenido en densidad óptima (220 org/m ³).....	73

Tabla 20. Concentración de compuestos metabólicos en el hepatopáncreas de <i>Penaeus vannamei</i> durante y después de la exposición a alta densidad de cultivo (1100 org/m ³), comparados con un grupo control mantenido en densidad de cultivo óptima (220 org/m ³).....	74
Tabla 21. Concentración de compuestos metabólicos en la hemolinfa de <i>Penaeus vannamei</i> durante y después de la exposición a alta densidad de cultivo (1100 org/m ³), comparados con un grupo control mantenido en densidad de cultivo óptima (220 org/m ³).....	75
Tabla 22. Concentración de nucleótidos adenílicos en el músculo del camarón blanco <i>P. vannamei</i> durante un periodo de estrés inducido por alta densidad de cultivo (1100 org/m ³), crecimiento compensatorio y fase de recuperación a densidad de cultivo óptima (220 org/m ³).....	77
Tabla 23. Número de lecturas de las bibliotecas genómicas secuenciadas a partir muestras de hepatopáncreas del bioensayo (3) de densidad de cultivo y porcentaje de alineamiento al genoma de referencia de camarón blanco <i>Penaeus vannamei</i>	81
Tabla 24. Estadísticas del ensamble de transcritos de las bibliotecas del bioensayo (3) de alta densidad de cultivo.....	81
Tabla 25. Número de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de <i>P. vannamei</i> expuesto a alta densidad de cultivo durante 14 días.....	82
Tabla 26. Términos de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de <i>P. vannamei</i> inducido por estresores temporales.....	85

Abreviaturas

AC	Alimento consumido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMP	Adenosin monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BAPNA	Benzoilarginina-Nitroanilida
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CAT	Catalasa
CC	Crecimiento compensatorio
ED	Expresión diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FCA	Factor de conversión alimenticia
g	Gramos
GO	Ontología génica
GPx	Glutación peroxidasa
GTP	Glutación trifosfato
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ID	Identificadores
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mg	Miligramos
min	Minutos
μl	Microlitros
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng	Nanogramos
PNR	Punto de no retorno
rpm	Revoluciones por minuto
S	Supervivencia
SAPNA	Succinil-Ala-p-Nitroanilida
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TCE	Tasa de crecimiento específico
Tris-HCl	Clorhidrato de trisaminometano
U	Unidades

Glosario

Biblioteca RNA-Seq	Colección de fragmentos de ADNc procedentes de un organismo, tejido u órgano, utilizadas para medir la expresión de genes.
Carga energética adenílica	Índice para medir el estado energético de las células.
Condiciones criogénicas	Referente a las técnicas usadas para enfriar materiales y/o tejidos a la temperatura de ebullición del nitrógeno o más bajas.
Fold change	Medida utilizada para comparar la expresión de genes entre dos condiciones o grupos diferentes.
Genes enriquecidos	Genes que están significativamente representados dentro de un conjunto de genes.
Hacinamiento	Referente a la acumulación excesiva de organismos en un mismo lugar.
Metilación de ADN	Mecanismo epigenético en el que un grupo metilo se adhiere al ADN y puede llegar a alterar la expresión de genes.
Muda	Estructura rígida compuesta por quitina que cubre el cuerpo de los artrópodos, incluyendo el camarón.
Ontología de genes	Clasificación de genes de acuerdo con 3 categorías: procesos biológicos, función molecular y componente celular.
RNAlater	Solución acuosa estabilizadora usada para proteger el ARN celular.
Transcrito	Copia de ARN generada a partir de una secuencia de ADN y que contiene información de genes para elaborar proteínas.
Valor phred	Parámetro usado en bioinformática para medir la calidad de las bases de ADN secuenciadas.

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura juega un papel primordial en el aporte de proteína de origen animal para consumo humano (Reynaud, 2008). Desde la década de los 80's, esta actividad se ha incrementado anualmente, superando progresivamente la producción de la pesca de captura (FAO, 2020). Además, esta actividad aporta diversos beneficios entre los que destaca la generación de empleos (Tidwell y Allan, 2001), la reducción del impacto en las poblaciones silvestres (Haroun *et al.*, 2011), la generación de divisas para países en desarrollo, el diseño de nuevas tecnologías apropiadas para los sistemas de cultivo, y el avance en el conocimiento de la fisiología de organismos acuáticos (Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

Entre los productos provenientes de este sector, el camarón es uno de los más demandados ante el agotamiento de sus poblaciones silvestres (Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016). En el 2018, la FAO estimó la producción acuícola mundial en 114.5 millones de toneladas, en donde el cultivo de crustáceos representó el 8.2%, dominado por el cultivo de camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*, con un 52.9%, lo que representó cerca de 69,300 millones de dólares (FAO, 2020). En el 2022, *P. vannamei* ocupó el primer lugar dentro de las 10 especies más cultivadas, con una producción de 6.8 millones de toneladas (FAO, 2024), en parte por su capacidad de adaptación a diversas condiciones de cultivo.

Con la finalidad de mejorar la rentabilidad del cultivo de *P. vannamei*, se ha estudiado la inducción del crecimiento compensatorio a través de estresores temporales como la restricción alimenticia, cambios de la densidad poblacional y la variación de temperatura. Sin embargo, existe muy poca información sobre los costos y ajustes metabólicos y genómicos que se generan en los camarones durante este proceso.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades y cultivo de *Penaeus vannamei*

El camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* (también llamado *Litopenaeus vannamei*), es un crustáceo perteneciente a la familia Penaeidae. Es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico; se distribuye desde Sonora, México, particularmente en el Golfo de California, hasta Tumbes, Perú, en aguas cuya temperatura es normalmente superior a 20°C durante todo el año (Treece y Yates, 1993). Los principales países en donde se desarrolla su cultivo son: Tailandia, China, Malasia, Ecuador, Venezuela, Brasil y México (FAO, 2016). La acuicultura de camarón en México se encuentra sostenida por esta especie y cerca del 97% de su cultivo se desarrolla en el Golfo de California, en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, 2023).

Habita en ambientes marinos con fondos lodosos a una profundidad máxima de 70 m, aunque es más común encontrarlo dentro de los primeros 25 m de profundidad (Treece y Yates, 1993). Los adultos se reproducen y desovan en aguas oceánicas en donde las larvas planctónicas permanecen alrededor de 2 semanas y posteriormente migran a sistemas estuarinos donde adquieren un hábito bentónico. Una vez que los juveniles alcanzan una talla entre 4 y 10 cm, migran hacia aguas oceánicas donde completan su madurez para comenzar de nuevo el ciclo. De esta manera, las larvas y juveniles se adaptan a ambientes altamente variables (Wyban *et al.*, 1995).

El cultivo de esta especie se desarrolla cerca de la línea de costa, en zonas con abastecimiento de agua como esteros, lagunas costeras y bahías (Instituto Nacional de Pesca, 2018). En un sistema convencional de cultivo larvario, después del desove, los nauplios se colocan en tanques de concreto o recubiertos con membranas plásticas donde se crían por lo general hasta post-larva (PL) 10 a 12 y posteriormente se transfieren a tanques de flujo rápido hasta PL30 (FAO, 2009).

El sistema de cultivo en estanques, está definido por la densidad de siembra de postlarvas (PL12-PL15) y la tecnificación utilizada en la producción: 1) Sistema extensivo: se siembran entre 4 y 10 PL/m² con una tasa de recambio de agua entre 5 y 10%; 2) Sistema semi-intensivo: con una densidad de siembra entre 10 y 30 PL/m² y un flujo de agua entre 10 y 20%; 3) Sistema intensivo:

presenta una densidad de siembra entre 60 y 300 PL/m² con un recambio de agua >20% y 4) Sistema hiper-intensivo: la densidad de siembra se encuentra entre 300 y 450 PL/m² con un recambio de agua >20% (Instituto Nacional de Pesca, 2018).

La alimentación de los nauplios consiste en microalga y *Artemia* y se complementa con alimento comercial seco o líquido (FAO, 2009); mientras que las postlarvas son alimentadas con pellets que varían en su contenido de proteína. La ración de alimento es calculada con base en estimaciones de la población, biomasa y con la ayuda de tablas de alimentación, haciendo ajustes semanales de acuerdo con la tasa de crecimiento observada (Rojas, *et al.*, 2005).

Respecto a los parámetros fisicoquímicos, *P. vannamei* tolera un amplio rango de salinidades que van desde 2 hasta 40 unidades prácticas de salinidad (ups), con un óptimo de 35 ups, así como un rango de temperatura que oscila entre 23 y 30°C, siendo su crecimiento óptimo a los 28°C (Martínez-Córdova, 1999). No obstante, durante su cultivo pueden presentarse variaciones que resultan estresantes para los camarones afectando su crecimiento. Cuando esto sucede y las condiciones de cultivo son restablecidas, los organismos pueden llegar a presentar crecimiento acelerado conocido como crecimiento compensatorio.

2.2 Respuesta fisiológica en camarón asociada a estresores ambientales

En los sistemas de cultivo se pretende mantener el control de las condiciones ambientales para el óptimo crecimiento del camarón. Sin embargo, suelen presentarse condiciones adversas, conocidas como estresores, que provocan una respuesta de estrés. Esta respuesta, en principio, permitiría mantener la homeostasis, pero frecuentemente tiene consecuencias negativas sobre procesos fundamentales como capacidad de respuesta inmune, crecimiento, capacidad reproductiva y supervivencia de los organismos (Chrousos y Gold, 1992; Abad-Rosales *et al.*, 2001; Mugnier *et al.*, 2008; Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2015; Zhu *et al.*, 2016). Entre estos estresores podemos mencionar privaciones o disminución de alimento, bajas temperaturas, altas densidades de cultivo, disminución en la concentración de oxígeno disuelto, entre otras (Marques y Lombardi, 2011).

Dependiendo de la intensidad del estresor, la respuesta en los organismos puede presentar dos niveles: 1) aquella que se presenta con un fin compensatorio que le permite al organismo recuperar total o parcialmente su estado de homeostasis a través del proceso conocido como crecimiento compensatorio y 2) la que resulta en la inhibición del crecimiento causada por agentes estresantes crónicos severos, generando un punto de no retorno al estado de homeostasis de los organismos (Wendelaar-Bonga, 1997).

Todos los organismos poseen mecanismos para mantener la homeostasis y sobrevivir a cualquier condición adversa, respondiendo a los cambios ambientales a través de ajustes metabólicos (Pigliucci, 1996) que tienen la finalidad de producir la energía necesaria para restablecer la condición de equilibrio. Por lo tanto, es común que durante la respuesta compensatoria de estrés, exista un aumento en la utilización del adenosín trifosfato (ATP) celular que tiene que compensarse aumentando la producción del mismo para poder mantener el balance energético celular (Moal *et al.*, 1989; Morris *et al.*, 2005). Para ello, los organismos utilizan su capacidad de adaptación para persistir en el medio ambiente a través de ajustes moleculares y metabólicos, que les proporciona la plasticidad fisiológica para hacer frente a los diversos estresores que experimentan en el medio donde se desarrollan (Re *et al.*, 2012).

En este sentido, se han propuesto diversos indicadores metabólicos de la respuesta a estrés en los organismos. Los más comunes son los niveles de glucosa y lactato en hemolinfa (Mugnier *et al.*, 2008), al igual que el colesterol, debido a que está implicado en la respuesta a estrés en crustáceos, ya que se ha observado que su contenido tiende a disminuir cuando los organismos son expuestos a un estrés térmico (Pascual *et al.*, 2003). Diversos estudios han reportado que la glucosa puede ser almacenada en forma de glucógeno en los principales tejidos de reserva, hepatopáncreas, músculo y branquias, para ser utilizada en respuesta a diversos estresores (Oliveira *et al.*, 2003; Buckup *et al.*, 2008). La glucosa es el principal monosacárido presente en la hemolinfa de crustáceos y sus niveles estables, reportados entre 10–20 mg dL (Sánchez *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003; Aguilar, 2009), son esenciales para el buen funcionamiento de los organismos. No obstante, la concentración de éste y otros metabolitos se puede alterar después de periodos de estrés, por lo que se han utilizado como indicadores para evaluar el estado metabólico de los organismos.

Pascual *et al.* (2003), observaron una disminución en los niveles de glucosa, lactato y colesterol en *Litopenaeus setiferus* al quinto día de ser expuestos a altas temperaturas (33°C), sin embargo, a partir del día 6 se observó un incremento variable en estos metabolitos sugiriendo que los organismos pudieron haber activado su mecanismo de compensación para mantener la homeostasis. En otros estudios con camarones peneidos se ha reportado que la concentración de glucosa en hemolinfa no varía con 4 semanas en alta densidad (Hall y Van Ham, 1998) o 7 días en condiciones de cautiverio (Sánchez *et al.*, 2001).

Jia *et al.* (2018), reportaron variaciones metabólicas en *Penaeus vannamei* bajo estrés térmico agudo durante 48 h. Adicionalmente observaron un incremento en la actividad de las enzimas lactato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa, relacionadas con el metabolismo anaerobio, durante las primeras horas de exposición; sin embargo, entre las 24-48 h después de iniciado el estrés, la concentración de estas enzimas regresó a su nivel basal, indicando la recuperación de la respiración aerobia. Así mismo, los camarones peneidos metabolizan la glucosa a lactato a través del metabolismo anaerobio como respuesta frente a diversos estresores como exposición al amonio (Racotta y Hernández-Herrera *et al.*, 2002), manipulación física (Racotta y Palacios, 1998; Mercier *et al.*, 2006), hipoxia (Pérez-Rostro *et al.*, 2004), entre otros.

Un tipo particular de estrés a nivel celular es denominado estrés oxidativo que ocurre en respuesta a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Cambios ambientales en la salinidad, temperatura y oxígeno disuelto, además de factores como la radiación ultravioleta y la densidad de cultivo, alteran la tasa respiratoria y metabólica de los organismos, y en consecuencia la producción de ERO (Ahuejote-Sandoval, 2004; Fanjul-Moles y Gonsebatt, 2012; Martínez-Canto *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2017). Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno que reaccionan fácilmente con otras moléculas y tienen una vida media corta (Martínez-Cayuela, 1998; Alessio y Hagerman, 2006); incluyen radicales libres que contienen electrones no apareados, como el radical superóxido (O_2^-) y, moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Dichas ERO producen daño oxidativo a biomoléculas tales como proteínas, ADN, ARN y lípidos poliinsaturados de membrana (Halliwell, 2009; Yoshida *et al.*, 2012). Para contrarrestar el daño y mantener así la homeostasis, existen defensas antioxidantes, que son enzimas que neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ERO) tal como superóxido dismutasa (SOD), enzimas encargadas de

inactivar peróxidos como la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y peroxiredoxinas, además de enzimas detoxificantes como la glutatión S-transferasa (GST) (Blokhina *et al.*, 2003; Valko *et al.*, 2007).

La respuesta del sistema antioxidante puede variar dependiendo de las condiciones que generan el estrés. Se ha observado que durante periodos de hipoxia se incrementa la producción de ERO y en consecuencia la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en músculo y hepatopáncreas del camarón blanco, *P. vannamei* sugiriendo un mecanismo de adaptación del camarón para tolerar tal condición y evitar el daño oxidativo (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011). Por el contrario, el estrés crónico por el hacinamiento asociado con una alta densidad genera un desbalance entre la producción de ERO y el mecanismo de protección antioxidante (Andrade *et al.*, 2015), lo cual se refleja en la reducción o inhibición de la capacidad antioxidante y la sobreproducción de malondialdehído, producto final de la peroxidación lipídica (Gawel *et al.*, 2004) indicando daño oxidativo, tal como se ha observado en el esturión chino *Acipenser sinensis* (Bi *et al.*, 2023) y el camarón *P. vannamei* (Gao *et al.*, 2017).

Por otro lado, el hepatopáncreas o glándula digestiva generalmente es considerada como un órgano de almacenamiento en los crustáceos decápodos (Allen, 1971), observando que el nivel de enzimas digestivas en este órgano se altera ante factores externos e internos, por lo que su estudio es de particular interés debido a su papel en la movilización de reservas ante estresores (Comoglio *et al.*, 2004). Cabe señalar que la actividad de enzimas digestivas promueve la absorción de los nutrientes requeridos ante distintas situaciones, por lo tanto, su actividad influye en la tasa de crecimiento y la eficiencia de conversión alimenticia al incrementar la absorción de nutrientes (Rosas *et al.*, 2002). En el año 2016, Zhu *et al.*, observaron que ciclos de ayuno intermitente mejoraron la digestión y absorción en *P. vannamei* durante la etapa de realimentación. Zhang *et al.* (2010), observaron que la actividad proteasa disminuyó en *Fenneropenaeus chinensis* debido a la restricción alimenticia, obteniendo una respuesta opuesta en las actividades lipasa y amilasa. Resultados similares fueron observados en *P. vannamei* cuando los organismos fueron sometidos a 120 h de ayuno (Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2002). Por otro lado, Rocha *et al.* (2019), observaron que *P. vannamei* puede responder a

periodos de ayuno utilizando sus reservas hepatopancreáticas como fuente de energía al reducir la actividad enzimática digestiva.

Por otra parte, se ha reportado que las proteínas funcionan principalmente como moléculas estructurales y catalizadores biológicos. Los camarones peneidos, están adaptados para utilizarlas como fuente de energía a partir de la hidrólisis o de los aminoácidos que obtienen de la dieta (Rosas *et al.*, 2002). Ante un periodo de estrés los niveles de proteína pueden disminuir (Chen *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2001), sin embargo, pueden restablecerse al sexto día frente a un estrés térmico, al igual que los niveles de triglicéridos (Pascual *et al.*, 2003). Aunque los lípidos no son la principal fuente de energía en crustáceos, se ha reportado que pueden movilizarse en condiciones de ayuno. Sánchez-Paz *et al.* (2007), observaron una disminución de acilglicéridos y lípidos totales en hemolinfa de *P. vannamei* después de 48 h de ayuno, cuando los niveles de glucosa disminuyeron a su mínimo nivel. Así mismo, se ha observado una disminución de triglicéridos frente a estrés térmico (Sánchez *et al.*, 2001) y por manipulación prolongada (Mercier *et al.*, 2006). De hecho, en los camarones los triglicéridos son proveedores indispensables de energía almacenada (Bray *et al.*, 1990).

2.3 Estrés temporal y crecimiento compensatorio

El crecimiento compensatorio (CC) es una respuesta fisiológica que se presenta en los organismos después de un periodo de estrés temporal con condiciones sub-óptimas para el crecimiento de los organismos, y se refleja en un crecimiento acelerado cuando las condiciones favorables son restablecidas (Ali *et al.*, 2003; Fóes *et al.*, 2016).

La compensación del crecimiento puede manifestarse en diferentes formas una vez que las condiciones óptimas se restablecen: 1) compensación completa, cuando los organismos que estuvieron estresados temporalmente, alcanzan eventualmente el mismo peso que los organismos no estresados; 2) compensación parcial, cuando los organismos temporalmente estresados en un periodo previo muestran tasas de crecimiento relativamente más altas y pueden presentar mejores tasas de conversión alimenticia que la de los organismos no estresados, sin alcanzar el mismo peso que éstos; y 3) sobrecompensación, cuando los organismos que han

pasado por un estrés temporal alcanzan mayor peso que los organismos no estresados. Por el contrario, cuando el estrés es severo y/o prolongado, se genera un punto de no retorno (PNR) en el que los organismos son incapaces de compensar su crecimiento (Wendelaar-Bonga, 1997; Ali *et al.*, 2003) (Fig. 1).

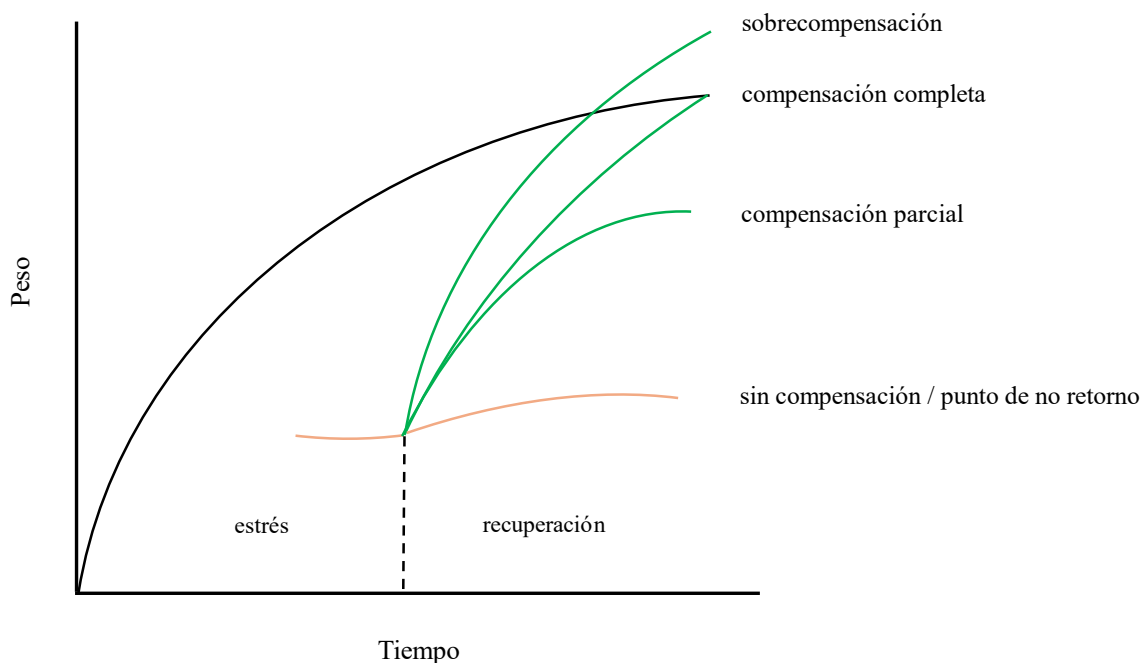


Figura 1. Tipos de crecimiento compensatorio (líneas verdes) comparados con el peso de organismos no estresados (línea negra). Modificado de Ali *et al.*, 2003.

Por lo general, el CC es más evidente entre los 10 y 30 días después de que las condiciones óptimas son restablecidas y se caracteriza por una mayor eficiencia en la utilización del alimento y por lo tanto conversiones alimenticias más bajas, lo que se refleja en una tasa de crecimiento más elevada (Dobson y Holmes, 1984; Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2015). Por esta razón, en diversos estudios sobre CC, la tasa de crecimiento específico es usada como un indicador de crecimiento acelerado (Wu y Dong, 2002).

Se ha analizado la inducción del CC como una estrategia para optimizar la producción en los sistemas de cultivo convencionales, además de contribuir a la demanda mundial de generar una producción acuícola que sea sustentable. Para inducir este proceso se requieren dos fases: una

de estrés cuando el crecimiento es reprimido, seguida de otra fase en la que desaparecen los estresores y las condiciones son restablecidas (Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2015).

La mayoría de los estudios realizados sobre CC han sido desarrollados con ganado y aves (Luna-Pinto y Cronjé, 2000; Suárez-García *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2018). Sin embargo, los estudios sobre crecimiento compensatorio en organismos acuáticos se han intensificado desde 1970 debido a las implicaciones que tiene en la acuicultura (Fóes *et al.*, 2016); su estudio se ha enfocado en peces (Hayward *et al.*, 2000; Jiwyam, 2010; Ali *et al.*, 2016), aunque también existen reportes en moluscos (Auster and Stewart, 1984) y en camarón tal como se expone a continuación.

2.3.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento compensatorio

Se ha sugerido que el CC inducido por variación de temperatura podría ser una estrategia aplicable en regiones con clima subtropical o templado donde la producción de camarones está limitada por las bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo.

Hostins *et al.* (2015), indujeron CC en postlarvas del camarón rosa, *Farfantepenaeus brasiliensis*, durante 30 días y encontraron que los organismos expuestos a bajas temperaturas (21°C) durante la etapa de pre-cría, compensaron por completo su crecimiento una semana después de que la temperatura óptima para su crecimiento (30°C) fue restablecida. Por el contrario, Prates *et al.* (2020), observaron que juveniles de *P. vannamei* expuestos a 20 y 24°C durante 35 días, mostraron altas tasas de crecimiento semanal una vez que se recuperó la temperatura óptima para su crecimiento (28°C), sin embargo, no presentaron el mismo peso final que los organismos control mantenidos a 28°C, lo cual sugiere que los organismos presentaron un CC parcial. En este sentido, se ha mencionado que la temperatura óptima de crecimiento para camarones penaeidos es especie-específica (Kumlu y Erol Dogan, 2000) y que *P. vannamei* es altamente sensible a pequeños cambios térmicos entre 23 y 27°C (Abdelrahman *et al.*, 2019). Así mismo, se ha reportado que una temperatura por debajo de 23°C afecta negativamente el crecimiento de esta especie (Wyban *et al.*, 1995), lo que podría explicar el CC parcial observado por Prates *et al.* (2020).

2.3.2 Efecto de la restricción alimenticia en el crecimiento compensatorio

Dentro de las estrategias para inducir el CC en camarón, la restricción alimenticia ha sido la más estudiada debido al interés por reducir los altos costos de producción invertidos en alimento, de modo que se han evaluado diversos regímenes de restricción alimenticia total (ayuno) y parcial en camarones.

Wu y Dong (2002), evaluaron el CC por el efecto combinado de la restricción alimenticia total a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 28°C) en el camarón chino, *Fenneropenaeus chinensis*; los organismos fueron mantenidos sin alimentación por 6 días y posteriormente fueron alimentados a saciedad por 30 días. Al final del experimento, los camarones mantenidos a 18, 22 y 26°C alcanzaron el mismo peso que aquellos alimentados a saciedad durante todo el experimento, lo cual sugiere un CC completo.

En el 2010, Zhang *et al.*, observaron que juveniles de *F. chinensis* en periodos de ayuno de 4 y 8 días seguidos de una realimentación a saciedad durante 20 y 16 días, respectivamente, incrementaron significativamente la ingesta de alimentos y la eficiencia de conversión alimenticia, lo que resultó en una tasa de crecimiento específico significativamente mayor que en los camarones sin restricción alimenticia, sugiriendo un CC completo.

Zhu *et al.* (2016), evaluaron ciclos de ayuno intermitente en juveniles de *P. vannamei*, los cuales consistieron en 1 día de ayuno y 3 de alimentación durante 36 días; los autores reportaron que la eficiencia de conversión alimenticia y el índice de eficiencia proteica, fueron significativamente mayores en los grupos tratados con respecto al control, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos respecto al peso final, lo que sugiere que los organismos tratados compensaron su crecimiento completamente. Resultados similares encontraron Rocha *et al.* (2019), quienes de igual manera evaluaron ciclos de ayuno/alimentación por 30 días, seguidos de 28 días de realimentación continua, como estrategia para inducir el crecimiento compensatorio en *P. vannamei* en un sistema biofloc. Los autores reportaron que durante los ciclos de restricción alimenticia los organismos del grupo control mostraron mayor crecimiento que los organismos tratados; sin embargo, al finalizar el experimento no se observaron diferencias significativas en la biomasa final obtenida en ambos grupos debido a que

la supervivencia fue mayor en los organismos tratados, así como la tasa de conversión alimenticia y la tasa de crecimiento específico. Por lo tanto, sugieren que los organismos sometidos a ciclos continuos de 1 día de ayuno/1 día de alimentación, pueden compensar solo de manera parcial su crecimiento al reducir la cantidad de alimento suministrado hasta un 50%, sin comprometer la biomasa final obtenida.

Por otra parte, se han analizado ciclos de privación alimenticia a largo plazo sobre el CC en *P. vannamei*. Yildirim y Aktas (2018), evaluaron ciclos de ayuno/alimentación seguida de una etapa de alimentación a saciedad en postlarvas de *P. vannamei*, durante 15 semanas. Las primeras 8 semanas evaluaron cinco regímenes alimenticios: 1:1, 2:2, 4:4, 7:7 (días de ayuno:alimentación) y un grupo control alimentado a saciedad; posteriormente todos los grupos fueron alimentados a saciedad por 7 semanas. Los resultados mostraron que *P. vannamei* es capaz de adaptarse a ciclos de largo plazo de ayuno:alimentación, porque ninguno de los regímenes evaluados afectó la supervivencia de los camarones. Durante las 7 semanas de alimentación a saciedad, los organismos con alimentación cíclica mostraron una tasa de crecimiento específica mayor que la del grupo control; sin embargo, ésta disminuyó conforme aumentó la duración de los ciclos de ayuno:alimentación. Se presentó crecimiento compensatorio en todos los regímenes de alimentación evaluados, pero con ninguno de ellos se obtuvo el mismo peso que los organismos alimentados continuamente durante las 15 semanas, por lo que el CC fue parcial.

De igual manera, Prates *et al.* (2020), evaluaron una fase de restricción alimenticia del 60% durante 35 días y posteriormente una fase de alimentación a saciedad por 30 días en juveniles de *P. vannamei*. Durante la fase de restricción, los camarones tratados mostraron un crecimiento significativamente menor que el grupo control alimentado a saciedad; sin embargo, durante la fase de realimentación al 100%, no se encontraron diferencias significativas en el peso final de los organismos de ambos grupos, lo que indicó una compensación completa del crecimiento.

De acuerdo con estos estudios, la estrategia de restricción alimenticia total o parcial, permite una reducción en la cantidad de alimento sin afectar de manera significativa el peso final de los organismos cultivados. A su vez, esta reducción disminuye la cantidad de alimento lixiviado, en consecuencia, las concentraciones de componentes como nitrógeno y fósforo en los efluentes también se reducen (Zhu *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2019).

2.3.3 Efecto de la densidad de cultivo en el crecimiento compensatorio

Otros estresores, como la densidad de cultivo, han sido evaluados en cultivos comerciales. Valverde-Moya y Alfaro-Montoya (2015), compararon dos estrategias para engorda de *P. vannamei* en un cultivo comercial, partiendo de una pre-cría de postlarvas (3.3 mg/PL) a alta densidad (85 m²). La primer estrategia Pre-cría:Pre-engorda:Engorda (PC:PE:E), consistió en transferir a los organismos de pre-cría, a un estanque de pre-engorda en densidad media (23.3 m²) y posteriormente a un estanque de engorda en densidad baja (8.6 org/m²); la segunda estrategia Pre-cría:Engorda (PC:E) consistió en transferir directamente los organismos de pre-cría en densidad alta a estanques de engorda en densidad baja (9.4 org/m²). Los autores reportaron un CC parcial, respecto a una tasa teórica mínima de 1 g por semana, cuando se da un cambio radical en la densidad de siembra de alta a baja. Además, la biomasa final obtenida con la estrategia PC:E fue aproximadamente el doble respecto a la PC:PE:E debido a que pudieron realizarse 3 ciclos de cultivo durante el periodo de producción en lugar de 2 con esta última.

Fóes *et al.* (2016), analizaron el confinamiento de *P. vannamei* en una situación de alta densidad poblacional (2000 org/m²) en una pre-engorda a corto (18 días) y largo plazo (144 días), sobre su crecimiento en los estanques de engorda a una densidad de 20 org/m², donde permanecieron por 101 días. Sus resultados mostraron que cuando los organismos son transferidos a un entorno menos estresante con una densidad poblacional más baja, el crecimiento y supervivencia de los organismos mantenidos a largo plazo en densidad alta, son similares a los observados en organismos cultivados bajo prácticas de manejo convencionales en estanques de engorda, por lo que siguieron que se presentó un CC completo.

El mantenimiento de organismos en pre-cría o pre-engorda en densidad alta aumenta la productividad de los cultivos cuando los organismos son transferidos a la fase de engorda donde se reducen las densidades de cultivo. Esta estrategia genera diversas ventajas como mayor control de enfermedades que se reflejan en una alta supervivencia y la reducción de la susceptibilidad de los organismos a nuevas condiciones de cultivo; además de inducir el crecimiento compensatorio parcial o completo de los organismos (Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2015; Fóes *et al.*, 2016). Por otro lado, implica menor uso de espacio durante el periodo

de confinamiento, y en consecuencia, hay reducción en los costos de producción (Wasiolesky *et al.*, 2013).

2.4 Expresión diferencial de genes asociados con alteraciones ambientales

Estudios recientes han analizado la expresión diferencial de genes frente a diversos estresores. He *et al.* (2015), observaron que durante el crecimiento compensatorio de carpas sometidas a inanición/realimentación hubo una expresión diferencial de genes (ED), la mayoría de éstos involucrados en procesos metabólicos o codificando enzimas y proteínas con actividad catalítica. Poblete-Abuter (2010), señaló que, en el lenguado chileno, *Paralichthys adspersus*, la expresión de los transcritos igf-I, igf-Ir, ghr, mck y miostatina presentan una respuesta diferencial bajo condiciones de restricción nutricional y realimentación, formando parte de la respuesta endócrina implicada en el crecimiento compensatorio de este pez.

En estudios durante la fase de inanición en *P. vannamei*, Lin *et al.* (2012), encontraron que la expresión de integrina β disminuyó significativamente después de 0.5–5 días de inanición, mientras que la expresión de proteína de unión a β glucano (LGBP), peroxinectina (PX), profenoloxidasa (proPO I), proPO II, enzima activadora de profenoloxidasa (ppA) y $\alpha 2$ macroglobulina ($\alpha 2$ -M) se incrementaron a partir de 0.5–1 días. Por su parte, Ulaje-Fernández (2015), observó modificaciones a nivel de expresión de genes relacionados con el crecimiento y obtención de energía en *P. vannamei* bajo exposición crónica a variaciones de hipertermia e hipoxia; ambas condiciones indujeron una subexpresión de genes involucrados en la síntesis de proteínas y en la ruta de la glucólisis, no obstante, la hipertermia indujo una sobre-expresión de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, y la hipoxia de aquellos relacionados en los procesos de organización de membranas.

Shao *et al.* (2020), evaluaron el efecto de ciclos de inanición/realimentación en *P. vannamei* y observaron que el nivel de expresión de tripsina fue mayor en los tratamientos comparados con el control, por lo que concluyen que el crecimiento compensatorio puede atribuirse a la eficiencia alimenticia que se presenta después de la inanición.

2.5 Cambios epigenéticos causados por estresores ambientales

Se ha reportado que los mecanismos epigenéticos que afectan la expresión de los genes se desencadenan por estímulos ambientales, de modo que pueden mediar la plasticidad metabólica en los organismos. Los procesos epigenéticos están asociados a otros mecanismos de regulación genética como los factores de transcripción (Duncan *et al.*, 2014) que pueden activar, reducir o reprimir por completo la expresión de algunos genes (Bossdorf *et al.*, 2008). De esta manera, los mecanismos epigenéticos participan en la respuesta dinámica del genoma frente a cambios ambientales (Duncan *et al.*, 2014).

La metilación del ADN implica la adición de un grupo metilo (CH₃) a una secuencia de ADN, siendo el mecanismo más estudiado hasta ahora (Moghadam *et al.*, 2015). Se han encontrado asociaciones entre la metilación de ADN y diversos parámetros, como el crecimiento (Navarro-Martin *et al.*, 2011; Covelo-Soto *et al.*, 2015; Venney *et al.*, 2016; Gavery y Roberts, 2017; Jiang *et al.*, 2020;). Por ejemplo, en porcinos, se reportó que la suplementación alimenticia con un donador de metilos para hembras en gestación mejoró la tasa de crecimiento de la descendencia (Jin *et al.*, 2018). En el pez *Paralichthys olivaceus*, la expresión de genes relacionados con el crecimiento se asoció negativamente con la metilación del ADN (Huang *et al.*, 2018). Por otro lado, Navarro-Martín *et al.* (2011), demostraron que el aumento de la temperatura durante el desarrollo temprano de la lubina, *Dicentrarchus labrax*, aumenta la metilación del promotor de la aromatasa gonadal, enzima que convierte andrógenos en estrógenos, inhibiendo así la expresión de dicho gen y con ello se indujo la masculinización de las hembras.

Se conoce que la temperatura y alimentación influyen en la metilación del ADN contribuyendo al silenciamiento o expresión de genes, sin embargo, en camarón se desconocen los estresores que modifican su epigenética.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón en nuestro país representa un papel preponderante en la acuicultura, lo que ha permitido la generación de empleos y una gran derrama económica, que ha llevado a posicionar a México como el séptimo productor de camarón a nivel mundial.

Para continuar con la expansión de la actividad acuícola y transitar a sistemas sostenibles de producción, se requiere el desarrollo de nuevas estrategias de cultivo que permitan mejores rendimientos con el menor daño posible al ambiente.

Por esta razón, la estimulación del crecimiento compensatorio por estresores temporales resulta en una estrategia que, en un futuro, podría ser implementada en el cultivo de camarón y con ello optimizar su producción. Sin embargo, se requiere conocer los costos y ajustes metabólicos que ocurren en los organismos por este fenómeno ante distintos estresores y de esta manera proporcionar el conocimiento de las condiciones que estimulan el crecimiento del camarón sin comprometer la viabilidad del cultivo.

En el presente estudio se evaluó el efecto de estresores temporales como la restricción alimenticia total (ayuno), temperatura y densidad de cultivo en la respuesta de crecimiento compensatorio del camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei*.

4. HIPÓTESIS

Dado que la variación de las condiciones ambientales puede afectar el crecimiento del camarón, se espera que la capacidad de respuesta de crecimiento compensatorio del camarón blanco, *Penaeus vannamei*, sea dependiente de la severidad, duración y tipo de estresor. A su vez, esta respuesta dependerá de los ajustes fisiológicos que se presenten a nivel de enzimas digestivas, antioxidantes y movilización de compuestos metabólicos, y que se asocian con la metilación global de ADN y expresión de genes a nivel transcripcional. En conjunto, estos cambios se verán reflejados en el peso del camarón alcanzado al final del periodo de recuperación.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de distintas condiciones de estrés temporal sobre la capacidad de respuesta de crecimiento compensatorio del camarón blanco *Penaeus vannamei*, dilucidando los cambios fisiológicos y genómicos que intervienen durante este proceso.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el crecimiento compensatorio en camarón *Penaeus vannamei* bajo tres diferentes condiciones de estrés temporal: ayuno/temperatura, variación térmica y densidad de cultivo.
- Evaluar los indicadores de estrés oxidativo, la actividad enzimática digestiva, la composición bioquímica en tejidos de reserva, el estado bioenergético y la metilación global del ADN en camarón *Penaeus vannamei* durante el crecimiento compensatorio.
- Identificar genes asociados al crecimiento compensatorio en camarón *Penaeus vannamei*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Origen de los organismos experimentales

Para el bioensayo 1 (ayuno/temperatura) y el bioensayo 2 (variación térmica), las postlarvas (PL) fueron proporcionadas por la empresa Larvas Gran Mar, S.A. de C.V. en La Paz, Baja California Sur, México. Para el bioensayo 3 (densidad de cultivo), los organismos fueron proporcionados por la empresa Blue Genetics, en la misma localidad mencionada anteriormente.

Las PL fueron transportadas en bolsas con oxígeno dentro de una hielera al laboratorio de nutrición acuícola del CIBNOR, en La Paz, B.C.S., donde fueron aclimatadas en tanques de 700 L y mantenidas con aireación continua, control de temperatura (28°C) y alimentación a saciedad durante 3 semanas. Posteriormente, los organismos fueron transferidos a unidades experimentales en las que se llevó a cabo la inducción del crecimiento compensatorio por los factores controlados de estrés temporal.

6.2 Determinación del crecimiento compensatorio en camarón *Penaeus vannamei* inducido por estresores temporales

Los tratamientos evaluados y la inducción del crecimiento compensatorio se detallan en cada caso.

6.2.1 Bioensayo 1: Estrés temporal inducido por ayuno y temperatura

Con la finalidad de conocer el efecto combinado de dos estresores sobre el crecimiento compensatorio del camarón blanco, se llevó a cabo un bioensayo con duración de 5 semanas en el que se evaluó el efecto de periodos de ayuno a diferentes temperaturas. Se colocaron 12 organismos con peso inicial de 0.75 ± 0.05 g en acuarios de 50 L (240 org/m³). Se evaluaron periodos de ayuno de 3, 7 y 14 días. Simultáneamente, cada periodo fue analizado bajo tres temperaturas: 22°C (baja=B), 26°C (media=M) y 30°C (alta=A). En todos los tratamientos la etapa de estrés estuvo seguida de un periodo de recuperación en el que la alimentación se restableció a saciedad por el tiempo restante de las 5 semanas experimentales, partiendo del 10% de la

biomasa en cada acuario e incrementando o disminuyendo 1% la ración diaria con base en la ausencia o presencia de restos de alimento al día siguiente. Además, en los tratamientos a 22 y 26°C la temperatura fue restablecida gradualmente subiendo a 28°C durante las primeras 12 h y posteriormente 1°C cada 2 h hasta alcanzar 30°C en cada tratamiento. El grupo control se mantuvo con alimentación a saciedad y a 30°C durante el experimento. Todos los tratamientos fueron evaluados por triplicado; en el grupo control se colocaron tres réplicas por cada periodo de estrés evaluado (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño experimental del bioensayo de ayuno y variación de temperatura en camarón

Tratamiento	Temperatura durante estrés (°C)	Ayuno (días)	Recuperación (días)	Organismos por acuario	Número de réplicas
A3	30	3	32	12	3
A7		7	28	12	3
A14		14	21	12	3
M3	26	3	32	12	3
M7		7	28	12	3
M14		14	21	12	3
B3	22	3	32	12	3
B7		7	28	12	3
B14		14	21	12	3
Control	30	0	35	12	9

6.2.2 Bioensayo 2: Variación térmica como estresor temporal

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *P. vannamei* con un peso inicial de 0.50 ± 0.05 g por un periodo de 7 semanas. Los camarones fueron transferidas a 16 unidades experimentales de 100 L en grupos de 24 organismos (240 org/m^3). Se evaluó el efecto de la hipotermia (22°C) e hipertermia (32°C) en el camarón por periodos de 7 y 14 días en ambos casos. En el grupo control la temperatura se mantuvo a 28°C durante el periodo experimental. Después de estos periodos, la temperatura fue restablecida a 28°C en cada tratamiento bajo estrés térmico y mantenida hasta el final del experimento. Los tratamientos con variación térmica se evaluaron por triplicado mientras que el grupo control fue evaluado por cuadruplicado. La alimentación se

mantuvo a saciedad en todos los tratamientos partiendo del 10 % de la biomasa en cada acuario, ajustando la ración diaria en 1% de acuerdo con la presencia o ausencia de restos de alimento al día siguiente (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental del bioensayo de estrés térmico temporal en camarón.

Tratamiento	Temperatura durante estrés (°C)	Estrés (días)	Recuperación (días)	Organismos por acuario	Número de réplicas
TB7	22	7	42	24	3
TA7	32	7	42	24	3
TB14	22	14	35	24	3
TA14	32	14	35	24	3
Control	28	0	49	24	4

6.2.3 Bioensayo 3: Alta densidad de cultivo como inductor de crecimiento compensatorio

El efecto de la densidad de cultivo en camarón fue evaluado por 7 semanas. Camarones con peso inicial de 0.80 ± 0.013 g fueron transferidos a unidades experimentales de 100 L en grupos de 110 organismos y mantenidos en esta condición por periodos de 14 y 21 días. Al finalizar cada periodo, los organismos fueron transferidos a nuevas unidades experimentales con la misma capacidad, reduciendo la densidad a 22 organismos. Los tratamientos fueron contrastados con organismos control mantenidos a una densidad inicial de 22 organismos por unidad experimental. Los tratamientos se evaluaron por cuadruplicado, mientras que para el grupo control se colocaron 8 réplicas (Tabla 3). En todos los tratamientos se mantuvieron condiciones controladas de temperatura (28°C) y alimentación a saciedad partiendo del 10% de la biomasa en cada acuario, subiendo o bajando 1 % la ración diaria respecto a la biomasa, de acuerdo con la presencia o ausencia de restos de alimento al día siguiente.

Tabla 3. Diseño experimental del bioensayo de alta densidad de cultivo en camarón.

Tratamiento	Estrés (días)	Recuperación (días)	Organismos durante fase estrés	Número de réplicas	Organismos durante recuperación	Número de réplicas
D14	14	35	110	1	22	4
D21	21	28	110	1	22	4
Control	0	49	22	8	22	8

6.2.4 Control de parámetros fisicoquímicos

En los 3 bioensayos realizados se hicieron recambios diarios parciales de agua por succión mecánica con manguera para retirar las heces, mudas y el alimento no consumido. En los bioensayos 1 y 2, el recambio de agua fue del 10%, mientras que para el bioensayo 3 fue del 60% durante la fase de alta densidad. El agua marina empleada para el mantenimiento de organismos y las unidades experimentales fue filtrada a 1 μm y pasada a través de luz UV. La temperatura se mantuvo según cada requerimiento usando calentadores de vidrio sumergibles (Eheim, 200w, Deizisau, Alemania). El monitoreo de temperatura y oxígeno disuelto se llevó a cabo usando un multiparámetro (YSI 556 mps, Yellow Springs, EUA) y se midieron los niveles de amonio usando un kit comercial (API Marine, saltwater master test kit, Oldsmar, FL, EUA).

6.2.5 Parámetros zootécnicos

Se realizaron biometrías semanales para estimar la ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), alimento consumido (AC), factor de conversión alimenticia (FCA) y supervivencia (S) mediante las siguientes fórmulas:

$$GP (\%): (\text{Peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial} \times 100 \quad (1)$$

$$TCE (\% \text{ día}^{-1}): [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{días}] \times 100 \quad (2)$$

$$AC (\text{g/org}): \text{Alimento consumido por camarón} \quad (3)$$

$$FCA: \text{Alimento consumido} / \text{ganancia en peso (g)} \quad (4)$$

$$S (\%): \text{Número final de camarones} / \text{número inicial de camarones} \times 100 \quad (5)$$

6.2.6 Obtención de muestras

La obtención de muestras biológicas se llevó a cabo en tres periodos: al final del estrés, durante el periodo de crecimiento compensatorio y al final del periodo experimental. Muestras de hemolinfa, hepatopáncreas y músculo fueron obtenidas en cada fase para la realización de los análisis experimentales (Fig. 2).

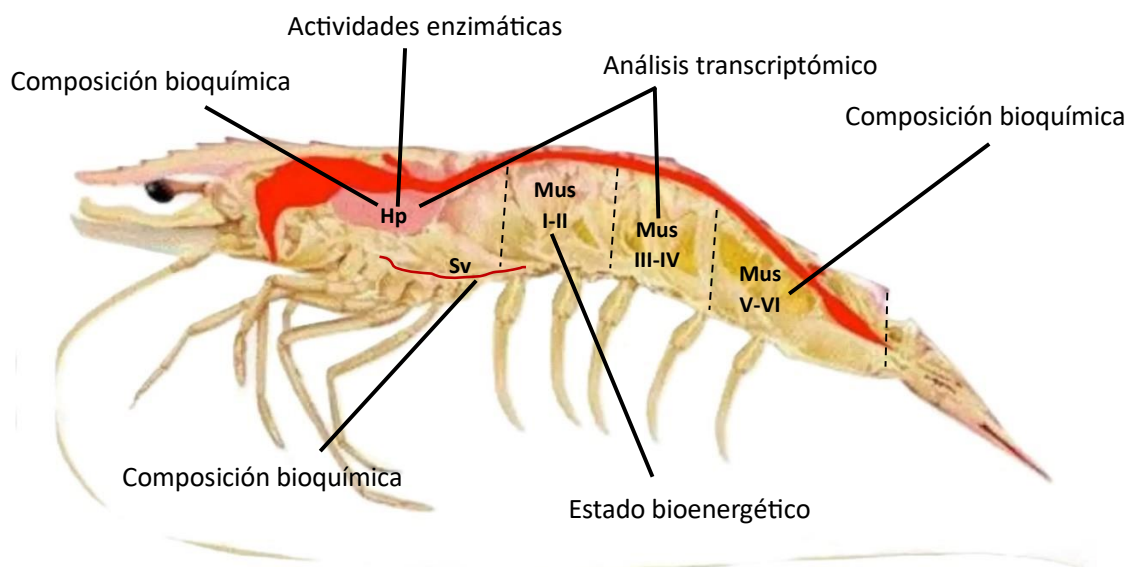


Figura 2. Representación gráfica de la obtención de muestras para el análisis fisiológico y transcriptómico de cada bioensayo. Hp hepatopáncreas; Mus músculo (segmentos I al VI); Sv seno ventral (obtención de hemolinfa). Imagen tomada y modificada de <https://es.slideshare.net/karlislcn/anatoma-y-fisiologa-de-los-camarones>

Para el análisis fisiológico en hemolinfa, se utilizaron jeringas para insulina (27 G x 37 mm) con 20 μ l de anticoagulante (oxalato de amonio 1.2% y oxalato de potasio 0.8%), extrayendo del seno ventral de 3 camarones \sim 100 μ l de hemolinfa. Posteriormente, las muestras extraídas se centrifugaron (3400 rpm, 4°C, 10 min) para obtener el plasma, el cual fue recuperado en tubos eppendorf y almacenado a -40°C hasta su análisis. Los hepatopáncreas y muestras de músculo obtenidos fueron colocados en tubos eppendorf e inmediatamente almacenados a -20°C hasta su uso.

Para el análisis del estado bioenergético fueron capturados 10 camarones con ayuda de una red, evitando más de 1 coletazo. Inmediatamente después de la captura, fueron transferidos a nitrógeno líquido y mantenidos a -80°C hasta su uso.

Para el análisis transcriptómico (expresión de genes), muestras de músculo y hepatopáncreas fueron colocadas, por separado, en tubos con RNAlater (1:10 p:v) y mantenidos a -80°C hasta su

uso (Figura 2). Para el análisis de metilación, muestras de músculo fueron colocadas en tubos con etanol al 90% y almacenadas a -20°C hasta su uso.

6.3 Respuesta fisiológica de *P. vannamei* inducida por estresores temporales

6.3.1 Determinación de actividad de enzimas antioxidantes

La actividad de las enzimas antioxidantes se evaluó utilizando un lector de microplacas usando kits colorimétricos (Cayman, USA) y fue expresada como U/mg de proteína.

6.3.1.1 Obtención de extractos

Se pesaron individualmente 4 hepatopáncreas por tratamiento y fueron transferidos a tubos eppendorf con 500 µl de buffer Tris-HCl + CaCl₂ (50 mM, 10mM, pH 8). Posteriormente fueron homogeneizados en FastPrep-24 (MP Biomedicals, Santa Anna, CA, EUA) por 3 ciclos de 30 s a 4.0 m/s. El extracto fue recuperado y transferido a tubos nuevos en alícuotas de ~50 µl.

Simultáneamente se realizó una curva de calibración usando una solución estándar de albúmina (1 mg/mL, Sigma) y se cuantificaron las proteínas solubles en los extractos enzimáticos mediante el método de Bradford (1976).

6.3.1.2 Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se evaluó midiendo la dismutación de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa e hipoxantina. Para este análisis se empleó el kit Cayman No. 706002 de la siguiente manera: se agregaron 200 µl de solución detectora y 10 µl del extracto diluido en cada pozo. La reacción se inició agregando 20 µl de xantina oxidasa. Se incubó la placa 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 440 nm. Simultáneamente se corrió una curva estándar y, la actividad SOD fue calculada con la siguiente fórmula:

$$SOD \left(\frac{U}{ml} \right) = \left[\left(\frac{\text{absorbancia linealizada} - \text{intercepto de } y}{\text{valor de la pendiente}} \right) \times \frac{0.23 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \right] \times \text{dilución extracto} \quad (6)$$

6.3.1.3 Catalasa (CAT)

Para el análisis de la actividad catalasa se empleó el kit Cayman No. 707002, cuyo método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se agregaron 100 μ l de buffer, 30 μ l de metanol y 20 μ l del extracto en cada pozo. La reacción inició al agregar 20 μ l de H_2O_2 diluido. Posteriormente, la placa se mantuvo en agitación orbital suave (50 rpm) durante 20 min a temperatura ambiente y después se agregaron 30 μ l de hidróxido de potasio para detener la reacción. La placa se mantuvo en a 50 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 10 μ l de peryodato de potasio manteniendo en agitación suave 5 min y se leyó la absorbancia a 540 nm. Simultáneamente se corrió una curva estándar con formaldehído.

Para determinar la actividad catalasa, se calculó la concentración de formaldehído en las muestras utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Formaldehído } (\mu\text{M}) = \left[\frac{\text{absorbancia de muestra} - \text{intercepto de } y}{\text{valor de la pendiente}} \right] \times \frac{0.17 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}} \quad (7)$$

$$\text{CAT (nmol/min/ml)} = \frac{\mu\text{M de formaldehído}}{20 \text{ min}} \times \text{dilución del extracto} \quad (8)$$

6.3.1.4 Glutación Peroxidasa (GPx)

Para el análisis de glutatión peroxidasa se empleó el kit de Cayman No. 703102, el cual mide la actividad de la enzima de manera indirecta mediante una reacción acoplada con la glutatión reductasa. Se agregaron 50 μ l de buffer, 50 μ l de la mezcla co-sustrato, 50 μ l de NADPH y 20 μ l del extracto en cada pozo. La reacción inició al agregar 20 μ l de hidroperóxido de cumeno e inmediatamente se leyó la absorbancia de las muestras a 340 nm cada minuto en un lapso de 5 min. Además de las muestras, se incluyó un control positivo y un blanco en el que el extracto se sustituyó con 20 μ l de buffer. Se determinó el cambio de absorbancia del blanco (ΔA) y este valor se restó a las absorbancias de cada muestra. Para el cálculo de la actividad GPx se usaron las siguientes fórmulas:

$$\Delta A_{340}/min = \frac{|A_{340}(\text{Tiempo 2}) - A_{340}(\text{Tiempo 1})|}{\text{Tiempo 2 (min)} - \text{Tiempo 1 (min)}} \quad (9)$$

$$GPx \text{ (nmol/min/mL)} = \frac{\Delta A_{340}/min}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} \times \text{dilución del extracto} \quad (10)$$

6.3.2 Determinación de actividad enzimática digestiva

La obtención de extractos enzimáticos se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 7.2.1.1. Todas las determinaciones fueron adecuadas a microplaca y la actividad enzimática expresada como U/ μg proteína⁻¹.

6.3.2.1 Amilasa

La actividad amilasa se midió de acuerdo con el método descrito por Vega-Villasante *et al.* (1993), usando almidón (1% en Tris-HCl 50 mM, pH 8) como sustrato. Se midió la absorbancia a 550 nm.

6.3.2.2 Lipasas

Para la determinación de la actividad lipasa se siguió el método descrito por Nolasco-Soria *et al.* (2018), usando β -naftil caprilato (19.2 mM) como sustrato. Se midió la absorbancia a 540 nm.

6.3.2.3 Tripsina y quimotripsina

Para evaluar la actividad tripsina se siguió el método descrito por Erlanger *et al.* (1961) usando BAPNA como sustrato, mientras que para la actividad quimotripsina se siguió el método descrito por Del Mar *et al.* (1979) usando SAPNA como sustrato. La mezcla de reacción incluyó Tris-HCl, CaCl₂ y la muestra de interés. La actividad enzimática fue medida a través de una cinética a 405 nm durante 15 min.

6.3.3 Determinación de metabolitos en tejidos de reserva

Se analizó la composición bioquímica en muestras de hemolinfa, hepatopáncreas y músculo. Proteínas, lactato, glucosa y triglicéridos fueron determinados en hemolinfa; proteínas, lactato y

glucógeno fueron determinados en músculo; proteínas, glucosa, glucógeno, lípidos totales, triglicéridos y colesterol fueron medidos en hepatopáncreas.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo usando el método del ácido bicinconínico (BCA), descrito por Smith *et al.* (1985). El contenido de glucógeno fue analizado mediante el método de antrona (Van Handel, 1965) y el contenido de lípidos con el método de sulfofosfovainillina (Barnes y Blackstock, 1973). Kits comerciales fueron usados para la determinación de glucosa (GOD-PAP, Randox, UK), lactato (PAP, Randox, UK), triglicéridos (GPO-PAP, Randox, UK) y colesterol (CHOD-PAP, Merck). La determinación de estos compuestos fue adaptada a microplaca (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Ulaje *et al.*, 2019).

6.3.3.1 Obtención de extractos

Para la obtención de extractos, las muestras de músculo y hepatopáncreas fueron previamente liofilizadas. Posteriormente, 20 mg del tejido liofilizado se colocaron en tubos nuevos con 1 mL de agua destilada. Las muestras de hemolinfa se diluyeron 1:30 para la determinación de compuestos.

En cada caso se analizó simultáneamente una curva estándar.

6.3.3.2 Proteínas

Para la determinación de proteínas en las muestras de músculo y hepatopáncreas, se tomaron 25 μ l del extracto hidratado y se mezclaron con 500 μ l de NaOH 0.1 N. Las muestras se digirieron durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se recuperaron 25 μ l en una microplaca y se agregaron 200 μ l de beta naftil caprilato (BCA). Las muestras se incubaron a 60°C por 15 min y se leyó la absorbancia a 562 nm. En el caso de la hemolinfa, se colocaron 20 μ l por muestra y no se llevó a cabo la digestión del tejido.

6.3.3.3 Lípidos totales

Se tomaron 25 μl de extracto y se mezclaron con 250 μl de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Las muestras se colocaron en baño maría durante 10 min a 90°C y después fueron enfriadas sobre hielo. Se recuperaron 20 μl en una microplaca y se agregaron 200 μl de vainillina. La microplaca se mantuvo en incubación durante 40 min y posteriormente se leyó la absorbancia a 540 nm.

6.3.3.4 Triglicéridos, colesterol, glucosa y lactato

En cada caso, 20 μl de extracto fueron colocados en una microplaca y mezclados con 200 μl de solución reactiva. Para glucosa la absorbancia se midió a 490 nm, mientras que el resto los compuestos se leyó a una absorbancia de 540 nm.

6.3.3.5 Glucógeno

Una alícuota de 100 μl del extracto fue mezclada con TCA (ácido tricloroacético) al 20% y se centrifugó a 3600 rpm durante 10 min a 4°C . Posteriormente, 25 μl del sobrenadante fueron transferidos a un tubo con 500 μl de etanol frío. Se centrifugó nuevamente bajo las condiciones descritas previamente y el alcohol fue descartado. El botón fue resuspendido en 25 μl de agua destilada y mezclado con 250 μl de antrona. Las muestras se calentaron a 85°C por 10 min e inmediatamente después enfriadas en baño de hielo. Finalmente, 200 μl de las muestras tratadas fueron colocados en una microplaca y se leyó la absorbancia a 620 nm.

6.3.4 Estado bioenergético

Para verificar el estado bioenergético de los camarones, se determinó la carga energética adenílica (CEA) y la concentración de arginin fosfato (ArgP) en las muestras del primer y segundo segmento abdominal del músculo, a través de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (HPLC, por sus siglas en inglés; modelo 1260 Infinity II, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

6.3.4.1 Obtención de extractos

Los extractos de músculo se realizaron siguiendo el método de Moal *et al.* (1989), con modificaciones descritas por Giannatassio *et al.* (2003) y Robles-Romo *et al.* (2014). Las muestras de tejido fueron pulverizadas en un molino mezclador (MM400, Retsch, Alemania) bajo condiciones criogénicas. El pulverizado (100 ± 40 mg) se homogenizó con 1.5 mL de ácido tricloroacético frío (TCA, 0.5 M) en un polytron (PT6100D, KINEMATICA, Suiza) a 3000 rpm durante 30 s en baño con hielo. El homogenado se centrifugó (3000 g por 10 min a 4°C) y el sobrenadante (500 μ l) fue neutralizado con 1.3 mL de trioctilamina:diclorometano (T:D, 1:5, v/v) frío. Las muestras se agitaron en vórtex (1 min) y se centrifugaron (2000 g durante 5 min a 4°C) para recuperar el extracto neutro (pH 7, 250 μ l). Los extractos se filtraron por una membrana de nylon (0.2 μ m, Agilent Technologies) y se almacenaron en viales ámbar con inserto (Agilent Technologies) en alícuotas de 100 μ l a -80°C.

6.3.4.2 Determinación de la carga energética adenílica

El extracto fue analizado en el HPLC usando una columna C18 hyperclone ODS (150 x 4.6 mm, 3 μ m tamaño de partícula; Phenomenex, Torrance, CA) y cartucho de seguridad C18 (40 x 3 mm; Phenomenex, Torrance, CA). Los nucleótidos fueron separados con un flujo de columna (fosfato monobásico de sodio 0.15 M, tetrabutilamonio 3 mM, con un gradiente de 3–10% metanol; pH 6.0; filtrada por una membrana de 0.45 μ m) de 0.8–0.9 ml/min durante 26 min a 25°C. La señal de los nucleótidos adenílicos fue detectada a 254 nm. La identificación de hipoxantina (HPX), xantina (XAN), ácido úrico (AU), inosina monofosfato (IMP), inosina (INO), nicotinamida difosfato (NAD), guanosin monofosfato (GDP), adenosin monofosfato (AMP), adenosin (ADN), guanosin trifosfato (GTP), adenosin difosfato (ADP) y adenosin trifosfato (ATP) se realizó con estándares comerciales (Sigma-Aldrich Merck). Todas las soluciones fueron preparadas con solventes grado HPLC (Fermont, Mexico). La carga energética adenílica (CEA) fue calculada de acuerdo con Atkinson (1968), mediante la fórmula:

$$CEA = \frac{[ATP + (0.5 \times ADP)]}{ATP + ADP + ADP} \quad (11)$$

6.3.4.3 Cuantificación de arginin fosfato (ArgP)

Los extractos obtenidos para el análisis de CEA, se incorporaron en una columna SphereClone (NH₂O 5 μm, 250 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA) y un cartucho de seguridad C18 (40 x 3 mm; Phenomenex, Torrance, CA). El flujo de columna (fosfato de potasio 0.5 M:acetonitrilo (72:28, v/v), pH 2.6, filtrada por una membrana de 0.45 μm) se mantuvo en 0.8 ml/min, durante 20 min a 26°C. La identificación de ArgP se realizó con un estándar comercial (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX) a una concentración conocida.

El cálculo de la concentración de los compuestos (nucleótidos y ArgP) en las muestras se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración del compuesto } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right) = [(A1 \times \text{std}/A2) \times \text{FD}/W]/1000 \quad (12)$$

Donde:

A1, representa el área del compuesto en la muestra; std, representa la concentración del volumen inyectado de estándar comercial (nmol); A2, es el área del compuesto en el estándar; FD, es el factor de dilución de la muestra; W, representa el peso del tejido pulverizado (g).

6.3.5 Metilación global del ADN

6.3.5.1 Extracción de ADN

A partir de muestras de músculo, se realizó la extracción de ADN usando el método de sales. Aproximadamente 0.1 g de tejido fueron colocados en tubos eppendorf con 400 μl de buffer de lisis y 2 μl de proteinasa K (10 μg/mL). Después de macerar el tejido con ayuda de un pistilo, las muestras fueron colocadas en baño maría a 60°C durante 1 h. Se adicionaron 200 μl de NaCl 5M y los tubos se colocaron en hielo por 10 min. Finalmente, se retiró el NaCl por centrifugación (12,000 rpm, 10 min, 4°C) y se realizaron dos lavados con etanol al 70%, descartando el sobrenadante entre cada lavado. La muestra se dejó secando a temperatura ambiente hasta evaporar los restos de etanol y posteriormente el ADN fue resuspendido en 50 μl de agua milliQ.

y cuantificado con el espectrofotómetro Qubit 3.0; su calidad fue verificada en geles de agarosa 1% (90 v, 30 min).

6.3.5.2 Cuantificación de la metilación global del ADN

La cantidad de ADN metilado se midió a través de la técnica de ELISA indirecta (Fig. 3) usando el kit MethylFlash™ global DNA methylation (5-mC) ELISA easy (colorimetric, EpigenTek, No. P-1030), siguiendo las instrucciones del fabricante. Simultáneamente se corrió una curva de calibración, y el porcentaje de metilación en las muestras se comparó con el porcentaje de metilación en el grupo control usando los valores de una regresión logarítmica:

$$\text{Metilación (\%)} = e^{\left[\frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{intercepto de Y}}{\text{valor de la pendiente}} \right]} \div 100 \text{ ng} \times 100\% \quad (13)$$

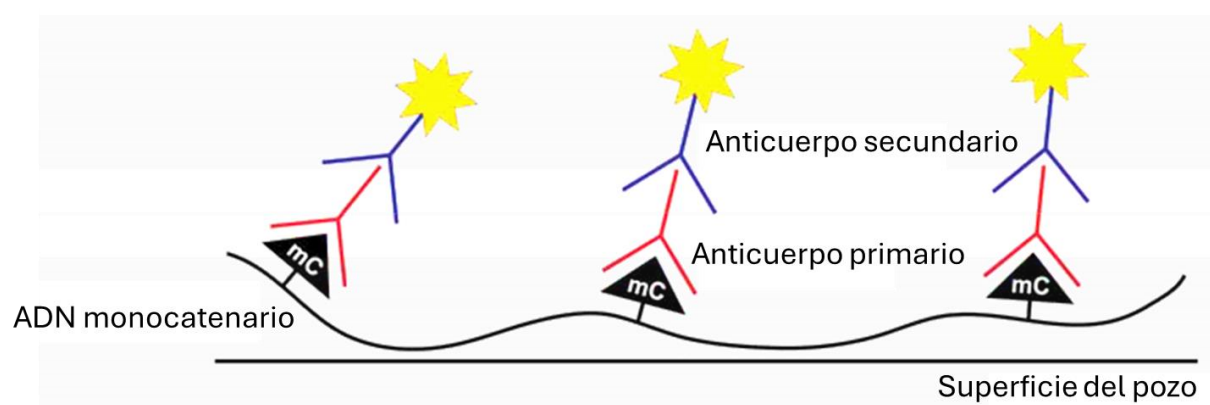


Figura 3. Diagrama de la técnica de ELISA indirecta donde el ADN metilado es adsorbido en la superficie del pozo donde es reconocido por un anticuerpo primario; este último a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario marcado, capaz de generar un producto detectable por espectrofotometría.

6.3.6 Análisis estadísticos

Para los parámetros zootécnicos y los resultados fisiológicos, se verificó la normalidad y homocedasticidad de los datos, posteriormente se realizó un ANOVA de 2 vías con el programa Statistica 8 para medir el porcentaje de metilación global del ADN, así como el efecto simultáneo de dos estresores (bioensayo 1). Se realizó ANOVA de 1 vía para los tratamientos en los que sólo

fue evaluado un estresor (bioensayos 2 y 3). Para determinar las diferencias entre tratamientos se aplicó la prueba post hoc de Tukey (95% de confianza).

6.4 Identificación de genes asociados al crecimiento compensatorio del camarón blanco

Para el bioensayo 1 (ayuno/temperatura) el análisis de expresión de genes se realizó a partir de muestras de músculo, mientras que para los bioensayos 2 (variación de temperatura) y 3 (densidad de cultivo) se realizó a partir de hepatopáncreas.

6.4.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo por triplicado. Para cada réplica se hizo un pool con dos muestras de tejido, analizando así un total de 6 individuos por tratamiento. Aproximadamente 2 mg de tejido se colocaron en un tubo eppendorf con 500 μ l de TRIzol™. Se realizó un macerado mecánico con pistilo para desintegrar el tejido y se agregaron 100 μ l de cloroformo frío. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C y la fase acuosa obtenida fue transferida a otro tubo eppendorf donde se mezcló vigorosamente con 250 μ l de isopropanol frío. La muestra se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el botón precipitado fue lavado dos veces con etanol al 70% centrifugando la muestra (12000 rpm, 5 min, 4°C) entre un lavado y otro. El sobrenadante fue descartado y la muestra se dejó secar a temperatura ambiente hasta evaporar los residuos de etanol. El ARN extraído fue resuspendido en 50 μ l de agua MilliQ estéril y se verificó su integridad por electroforesis en geles de agarosa 1% (90 v, 30 min). La cuantificación del ARN se realizó con el espectrofotómetro Qubit 3.0 y las muestras se enviaron en RNASTable a la empresa Novogen en donde evaluaron el valor de integridad de ARN (RIN) mediante Bioanalyzer. Se prepararon 3 bibliotecas por tratamiento, dando un total de 12 bibliotecas para el bioensayo de ayuno/temperatura (bioensayo 1), 6 bibliotecas para el bioensayo de variación térmica (bioensayo 2) y 6 bibliotecas para el bioensayo de densidad de cultivo (bioensayo 3). Las bibliotecas RNA-Seq fueron secuenciadas en la plataforma NovaSeq6000, Illumina obteniendo lecturas pareadas (paired-end) de 2 x 150 pb.

6.4.2 Análisis bioinformático

La calidad de las secuencias se visualizó con el programa FastQC y se determinaron los parámetros a utilizar para tener secuencias con un valor de calidad $Q > 30$ a través del programa Trimmomatic-0.32, eliminando adaptadores y lecturas de mala calidad utilizando las opciones ILLUMINACLIP TruSeq3-PE.fa:2:30:10 HEADCROP:13 SLIDINGWINDOW:4:28 MINLEN:30.

Todas las bibliotecas fueron mapeadas al genoma de referencia de *Penaeus vannamei* GCA_003789085.1_ASM378908v1 utilizando el programa HISAT-v2.1.0 y fueron ensambladas con el programa StringTie-v1.3.4 utilizando el servidor del laboratorio de Genómica y Bioinformática de CIBNOR (Fig. 4).

De cada tratamiento se cuantificaron los transcritos por biblioteca para obtener los FPKM (*Fragments per Kilobase Million*) utilizando StringTie-v1.3.4 y la matriz generada fue analizada en R para obtener la expresión diferencial con el paquete Ballgown. Se realizaron las comparaciones entre los tratamientos y su respectivo control. Los ID de los genes expresados diferencialmente fueron extraídos y se usaron para obtener la anotación del genoma de referencia. La ontología de estos genes fue obtenida de la base de datos de UniProt y se graficaron de acuerdo con su clasificación ontológica. El enriquecimiento de genes fue evaluado usando la herramienta String (versión 11.5) para el bioensayo 1, y la herramienta web DAVID (Huang *et al.*, 2009; Sherman *et al.*, 2022) para los bioensayos 2 y 3 (Fig. 4). Los genes enriquecidos fueron visualizados usando la plataforma REVIGO (Supek *et al.*, 2011).

6.4.3 Ontología de genes durante el CC inducido por distintos estresores

Se realizó un análisis comparativo mediante un diagrama de Venn, entre los genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio inducido por el ayuno, hipotermia y alta densidad de cultivo, con la finalidad de detectar su relación ontológica asociada a este proceso.

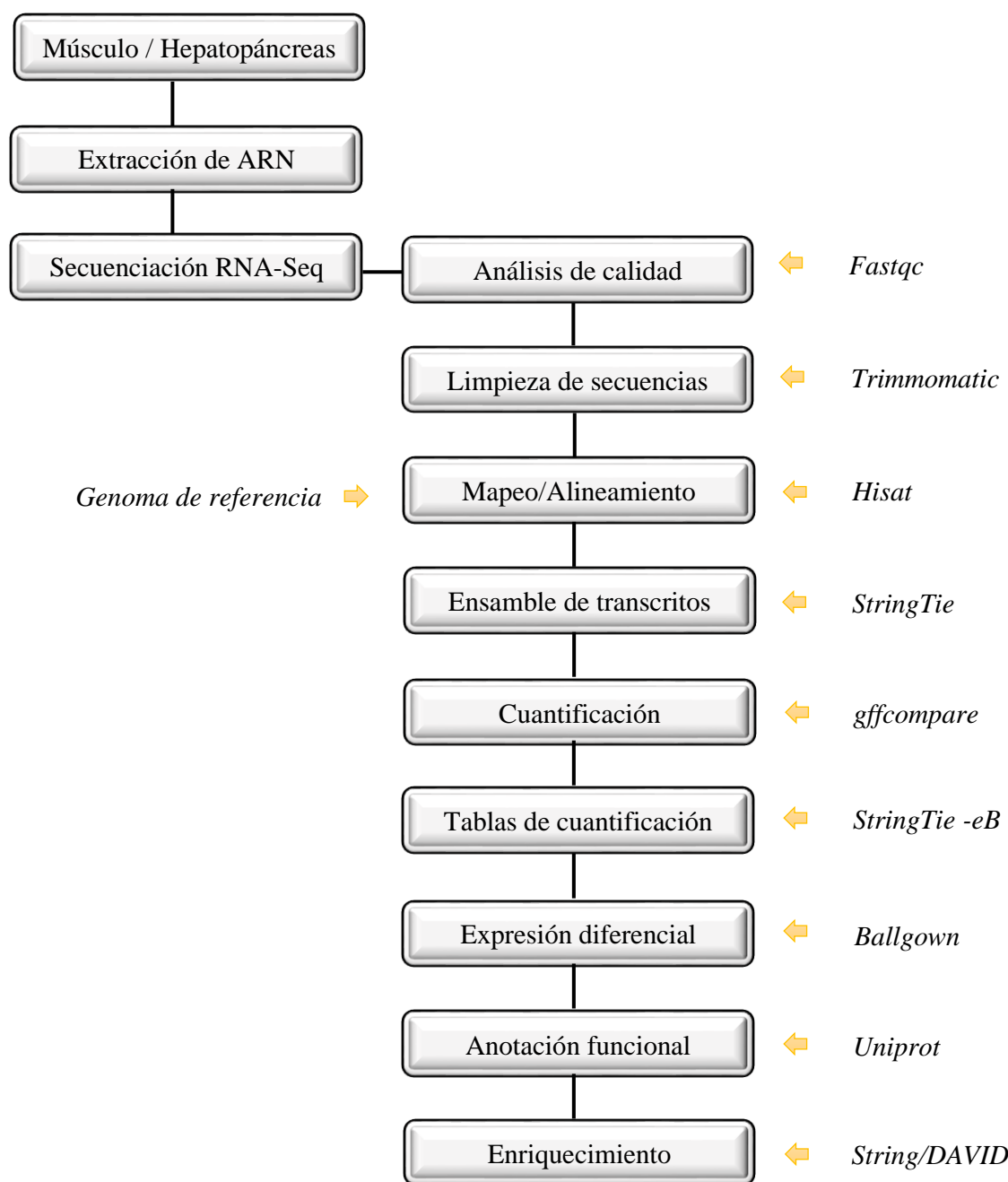


Figura 4. Diagrama de procesamiento de secuencias genómicas y análisis bioinformático.

6.4.4 Validación de genes expresados diferencialmente mediante qPCR

Del listado de genes expresados diferencialmente (ED) en el bioensayo 1, se seleccionaron 4 de manera aleatoria para validar los resultados del transcriptoma mediante la técnica de RT-qPCR. Se diseñaron primers específicos para los genes seleccionados (Tabla 4) verificando que no

formaran dímeros ni estructuras secundarias. Seis muestras de cada tratamiento, junto con su respectivo control, fueron usados para la extracción de ARN con TRIzol™ y la síntesis de ADNc con el kit M-MLV Transcriptasa reversa (Promega). Para la mezcla de reacción se agregó buffer 1X, dNTPs 0.15 mM, 0.3 U de GoTaq polimerasa (Promega) y compuesto fluorescente EvaGreen (Biotium, Fremont, CA). La concentración de primers y MgCl₂ usada para cada gen se señala en la Tabla 4, junto con la eficiencia de amplificación. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador CFX96 C1000 Touch™ (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: 95°C por 3 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s y 60°C por 30 s. Simultáneamente, se evaluaron los genes de referencia ARN ribosomal 18s (18S), proteína ribosomal L8 (RPL8) y factor de elongación 1-alfa (EF1a). La estabilidad de los primers fue calculada con la herramienta web RefFinder (<https://blooge.cn/RefFinder>). La expresión relativa de cada gen de interés fue calculada usando el método 2^{-ΔΔCt} (Livak y Schmittgen, 2001) y las diferencias entre los tratamientos fue calculada de acuerdo con lo descrito previamente en la sección 6.2.6.

Tabla 4. Secuencias, eficiencia de amplificación y concentración de primers para la validación de genes expresados diferencialmente.

Gen	Secuencia (5'3')	Eficiencia (%)	Concentración por reacción	
			Primer (mM)	MgCl ₂ (mM)
<i>AGL</i>	TCTCGTCTCTCCCTCTGA AACCTTCATCGCACATCTCC	99.7	0.15	3
<i>GPX4</i>	AGGTGAATGGGGATGATGC CTGGGTTTCCTTCTTTGTCG	92.5	1.53	3
<i>Nadk</i>	TGAGGTATGTGGCAGGGTTA GCAAGAATGATGGGATGACA	90.2	1.33	3
<i>Ddb1</i>	TCGCATCATCCTCTTCTCCT TCACGCTCATTGTCCATTC	101.5	1.66	2.5
<i>EF1a</i>	GGTCCCAGCAAGCCTATGT TCCTTGATCACACCCACAGC	91.7	0.13	1.8

7. RESULTADOS

Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los rangos de tolerancia para el camarón; la temperatura se mantuvo controlada en un rango de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ respecto a la temperatura requerida en cada bioensayo y el oxígeno a 5.5 ± 0.7 mg/L. Los niveles de amonio se mantuvieron por debajo de 2 mg/L a través de los recambios parciales de agua.

7.1 Bioensayo 1: Efecto del estrés temporal en *P. vannamei* inducido por ayuno y temperatura

7.1.1 Rendimiento productivo y supervivencia

La cinética de crecimiento demuestra una reducción significativa del peso del camarón ($p < 0.05$) durante la etapa de estrés en todos los tratamientos en comparación con el grupo control, así como variación en los tiempos de recuperación asociados a los días de ayuno (Anexo A). De este modo, el peso final de los organismos estuvo influenciado por la duración del periodo de ayuno, independientemente de la temperatura de los tratamientos. El mayor peso promedio fue observado en los tratamientos con el menor periodo de ayuno (Fig. 5).

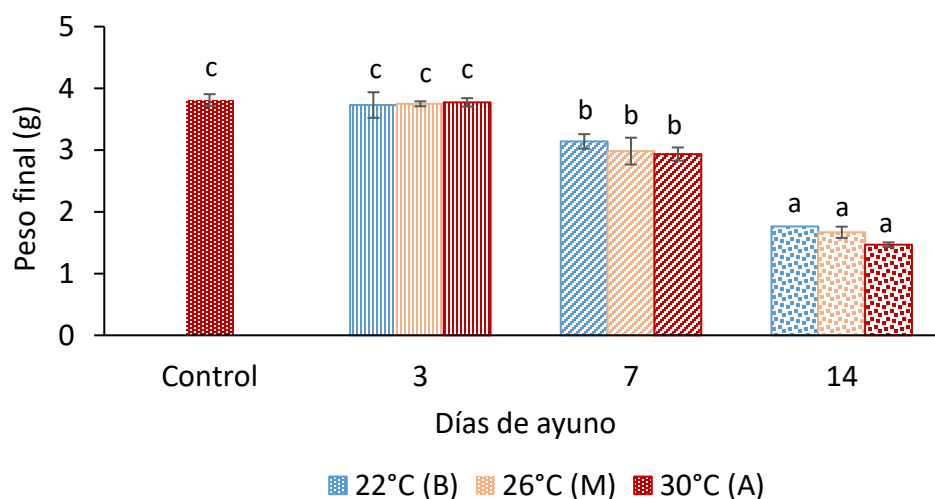


Figura 5. Peso promedio final del camarón blanco *Penaeus vannamei* sometido a distintos periodos de ayuno y temperatura. Valores significativos ($p < 0.05$) se indican con letras diferentes.

Se observó una ganancia en peso (GP) significativamente menor ($p < 0.001$) conforme el ayuno se prolongaba a 7 y 14 días. De este modo, en los grupos expuestos a 7 días de ayuno se observó una reducción del 26 % y del 71 % en los grupos de ayuno prolongado, respecto a la GP del grupo control, independientemente de la temperatura que influyó marginalmente ($p < 0.05$) con valores menores conforme al aumento de la temperatura. No se observaron diferencias significativas entre el ayuno de 3 días y el grupo control (Tabla 5). Respecto a la tasa de crecimiento específico total (TCE), se observó el mismo efecto del ayuno ($p < 0.001$) aunque dependió de la temperatura, tal como lo indica la interacción significativa ($p < 0.05$), con un efecto más pronunciado a temperaturas más altas (Tabla 5).

El consumo de alimento (CA) también fue mayor ($p < 0.001$) a menor duración del ayuno, aunque también se observó un efecto significativo por la interacción ($p < 0.001$). Así, a 26°C y 3 días de ayuno, el CA fue menor que a 22 y 30°C, mientras que, con 14 día de ayuno, el menor consumo fue a 30°C (Tabla 5). El factor de conversión alimenticia (FCA) fue mayor conforme se prolongaba el ayuno ($p < 0.001$), sin influencia significativa de la temperatura (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros zootécnicos observados en *Penaeus vannamei* expuesto a periodos de ayuno y temperatura.

Parámetro	Ayuno (días)									Anova de 2 vías (valor p)			
	30°C	30°C			26°C			22°C			Ayuno	T°	Int
		3	7	14	3	7	14	3	7	14			
GP (%)	403 ± 12 ^c	396 ± 9 ^c	285 ± 16 ^b	93 ± 5 ^a	396 ± 9 ^c	291 ± 28 ^b	120 ± 12 ^a	393 ± 11 ^c	313 ± 27 ^b	132 ± 16 ^a	<0.001	0.044	0.178
TCE (% día ⁻¹)	4.62 ± 0.07 ^d	4.58 ± 0.05 ^d	3.85 ± 0.12 ^c	1.88 ± 0.08 ^a	4.57 ± 0.05 ^d	3.89 ± 0.21 ^c	2.25 ± 0.16 ^{ab}	4.56 ± 0.07 ^d	4.05 ± 0.19 ^c	2.40 ± 0.19 ^b	<0.001	0.005	0.024
CA (g/org)	4.23 ± 0.12 ^e	4.22 ± 0.08 ^e	2.99 ± 0.01 ^c	1.23 ± 0.07 ^a	3.88 ± 0.13 ^d	3.12 ± 0.13 ^c	1.53 ± 0.11 ^b	4.04 ± 0.13 ^{de}	3.20 ± 0.06 ^c	1.71 ± 0.04 ^b	<0.001	0.003	<0.001
FCA	1.39 ± 0.04 ^a	1.40 ± 0.02 ^{ab}	1.38 ± 0.07 ^a	1.74 ± 0.16 ^c	1.30 ± 0.05 ^a	1.41 ± 0.10 ^{ab}	1.69 ± 0.11 ^{bc}	1.36 ± 0.05 ^a	1.35 ± 0.13 ^a	1.72 ± 0.17 ^c	<0.001	0.723	0.784

Valor promedio ± desviación estándar. GP= ganancia en peso, TCE= tasa de crecimiento específico, CA= consumo de alimento, FCA= factor de conversión alimenticia. En las claves de los tratamientos, la letra indica la temperatura: A= alta (30°C), M= media (26°C) y B= baja (22°C). T°= temperatura. Int= interacción. Los superíndices indican diferencias significativas ($p<0.05$).

En los tratamientos sometidos a 14 días de ayuno, la supervivencia fue inversamente proporcional al incremento de temperatura, siendo el tratamiento sometido a 30°C (A14) en el que se observó un porcentaje de supervivencia significativamente menor ($p < 0.05$) que el tratamiento sometido a 22°C (B14) y los tratamientos con 3 días de ayuno. No se encontraron diferencias significativas entre el resto de los tratamientos (Fig. 6).

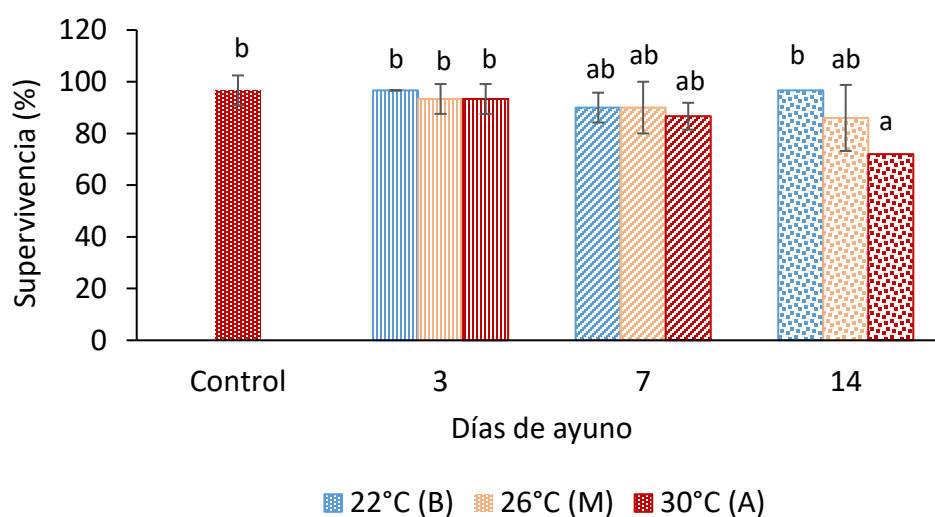


Figura 6. Porcentaje de supervivencia de *Penaeus vannamei* obtenido en tratamientos con diferentes periodos de ayuno y temperatura. Valores significativos ($p < 0.05$) se indican con letras diferentes por efecto de la interacción. Efecto del ayuno $p = 0.008$. Efecto de la temperatura $p = 0.017$.

Debido a que el efecto del ayuno fue más marcado que el de la temperatura, se analizó la tasa de crecimiento (TCE) de los organismos sometidos a diferentes días de ayuno a 30°C. Durante la primera semana de recuperación con alimentación a saciedad, los organismos expuestos a 3 días de ayuno mostraron una tasa de crecimiento significativamente mayor ($p < 0.05$) que la del grupo control, a diferencia de los organismos expuestos a 14 días de ayuno en donde la TCE fue significativamente menor ($p < 0.05$), aun cuando la alimentación fue restablecida. No se observaron diferencias significativas en la TCE de los camarones expuestos a 7 días de ayuno y el grupo control a los 7 días de recuperación con alimentación a saciedad (Fig. 7).

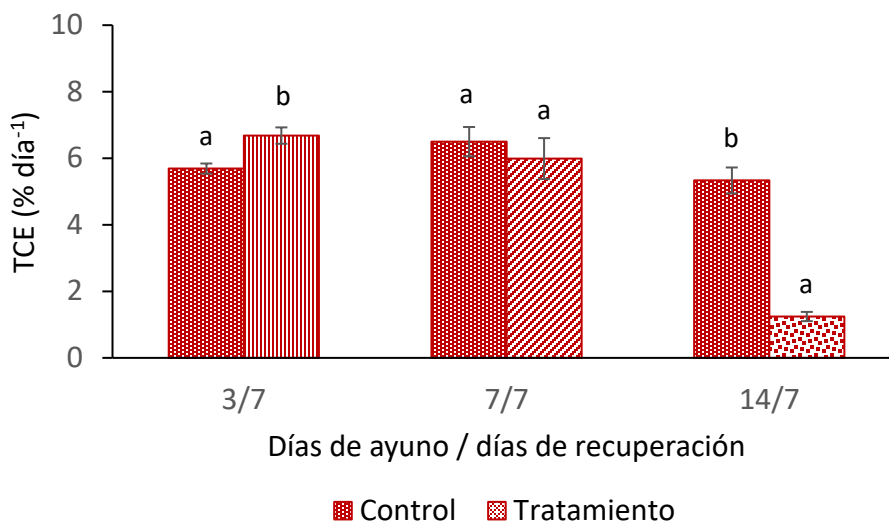


Figura 7. Tasa de crecimiento específico del camarón blanco *Penaeus vannamei* a los 7 días de recuperación con alimentación a saciedad después de 3, 7 y 14 días de ayuno a 30°C. Valores significativos ($p < 0.05$) se indican con letras diferentes.

Por otra parte, como se muestra en la Fig. 5, los organismos del tratamiento A3 compensaron completamente su crecimiento al final del experimento mientras que los organismos del tratamiento A14 no pudieron compensar su crecimiento durante el periodo experimental evaluado. Por estas razones, se seleccionó el tratamiento A3 para evaluar la expresión diferencial de genes asociada al crecimiento compensatorio inducido por restricción alimenticia total, así como el tratamiento A14 para evaluar la expresión diferencial de genes asociada a un punto de no retorno, con respecto a la capacidad de compensación del camarón. Cada tratamiento fue comparado con el grupo control obtenido en cada periodo y fueron denominados como CA3 y CA14, respectivamente.

7.1.2 Expresión de genes durante el crecimiento compensatorio y punto de no retorno del camarón *P. vannamei*

7.1.2.1 Extracción de ARN

La concentración del ARN extraído en muestras de los tratamientos seleccionados (A3, A14, CA3, CA14) fue mayor a 200 ng/μl (Tabla 6) y su calidad dentro de los parámetros requeridos para la construcción y secuenciación de bibliotecas genómicas.

Tabla 6. Concentración de ARN en muestras de tratamientos sometidos a restricción alimenticia total y grupos control.

Muestra	Clave de la biblioteca	ng/ μ l	260/280	260/230
A3-a	A3a	1759.4	2.11	1.75
A3-b	A3b	1201.2	2.10	1.70
A3-c	A3c	334.9	2.11	1.75
A14-a	A14a	1547.6	2.13	1.78
A14-b	A14b	1506.1	2.10	1.72
A14-c	A14c	283.6	2.12	1.56
Control A3-a	CA3a	993.5	2.10	1.96
Control A3-b	CA3b	856.4	2.09	1.78
Control A3-c	CA3c	786.6	2.08	1.82
Control A14-a	CA14a	1801.2	2.10	1.75
Control A14-b	CA14b	983.2	2.13	1.04
Control A14-c	CA14c	561.4	2.09	1.93

7.1.2.2 Análisis bioinformático

A partir de las secuencias genómicas obtenidas se realizó el análisis de calidad y se encontró que la mayoría de las muestras mostraron un valor Phred $Q>30$, sin embargo, presentaron algunas inconsistencias en el contenido de bases iniciales. En estos casos y cuando las secuencias mostraron un valor Phred menor, se usó el programa Trimomatic para remover las bases de baja calidad y eliminar adaptadores.

Al verificar el análisis de alineamiento al genoma de referencia de *P. vannamei* se observó un porcentaje de alineamiento superior al 90% en todas las muestras, excepto para la muestra CA14c (Tabla 7).

Tabla 7. Número de lecturas de las bibliotecas genómicas secuenciadas a partir de muestras de músculo del bioensayo (1) de ayuno/temperatura y porcentaje de alineamiento al genoma de referencia de camarón blanco *Penaeus vannamei*.

Muestra	Número de lecturas	Alineamiento (%)
A3a	39'849,123	92.10
A3b	42'444,008	92.91
A3c	25'210,495	91.68
A14a	42'049,445	95.36
A14b	49'228,933	95.04
A14c	22'274,003	91.64
CA3a	26'348,136	90.89
CA3b	19'436,958	90.77
CA3c	24'112,485	90.68
CA14a	40'240,964	93.95
CA14b	38'561,749	95.42
CA14c	22'439,701	89.23

A través del ensamble de transcritos con la herramienta StringTie, se observó un porcentaje de expresión del 12.7% de nuevos exones, los cuales podrían aportar información adicional al genoma anotado (Tabla 8).

Tabla 8. Estadísticas del ensamble de transcritos de las bibliotecas del bioensayo (1) de ayuno/temperatura.

Exones faltantes:	0 / 151856	(0.0%)
Nuevos exones:	23183 / 183171	(12.7%)
Intrones faltantes:	0 / 126329	(0.0%)
Nuevos intrones:	10823 / 142356	(7.6%)
Loci faltantes:	0 / 25527	(0.0%)
Nuevos loci:	7197 / 32512	(22.1%)

7.1.2.3 Análisis de expresión y ontología de genes

Al comparar los tratamientos A3 y A14 con su respectivo control, se observó mayor expresión diferencial de genes en el tratamiento A3 (862) respecto al tratamiento A14 (449) (Tabla 9). Esta diferencia en la expresión de genes se asocia con la respuesta de crecimiento compensatorio observada en los parámetros zootécnicos descritos previamente, donde el tratamiento A3 alcanzó un crecimiento compensatorio total y el tratamiento A14 no fue capaz de compensar su crecimiento llegando al punto de no retorno.

Se determinó el número de genes exclusivos sobre-expresados y subexpresados en cada muestra con base en el valor fold change ($fc < 1$ = subexpresión; $fc > 1$ sobre-expresión) (Tabla 9).

Tabla 9. Número de genes expresados diferencialmente con respecto al control.

Genes	Tratamiento A3	Tratamiento A14
Genes expresados diferencialmente (ED)	862	449
Genes únicos	580	337
Genes anotados	423	226
Genes exclusivos sobre-expresados	239	104
Genes exclusivos subexpresados	184	122

La relación entre los genes expresados diferencialmente entre ambos tratamientos se analizó en un diagrama de Venn (Fig. 8), obteniendo 72 genes compartidos, mientras que 508 se expresaron únicamente en el tratamiento A3 (exclusivos) y 265 sólo en el tratamiento A14 (exclusivos).

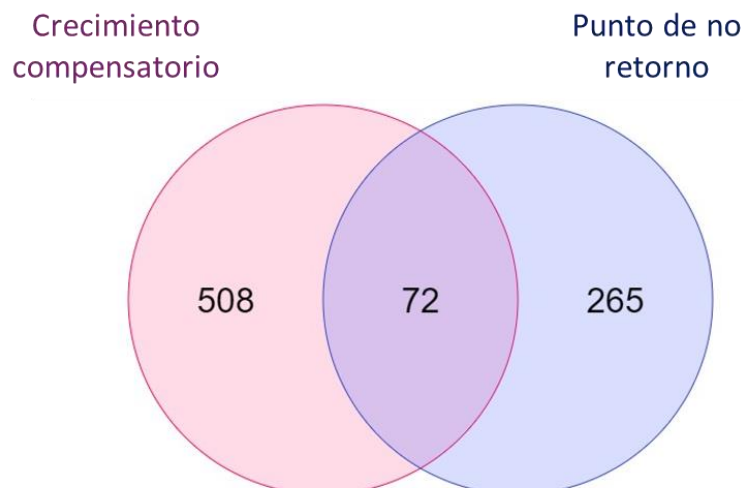


Figura 8. Diagrama de Venn que compara genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio y el punto de no retorno. En el centro se presentan los genes compartidos y a los extremos los genes expresados exclusivamente en cada condición.

De acuerdo con la clasificación ontológica durante el CC, en la categoría de componentes celular, el término con mayor número de genes fue la entidad anatómica celular (GO:0110165) donde se incluyen aquellos genes relacionados con el desarrollo y contracción del músculo. En la categoría de procesos biológicos (BP), los términos con mayor número de genes fueron los relacionados con procesos celulares (GO:0009987), metabólicos (GO:0008152) entre los que se incluyen los genes relacionados con el catabolismo de glucógeno y obtención de energía, de desarrollo (GO:0032502) y respuesta a estímulos (GO:0050896). Mientras que para la categoría de función molecular (MF), los términos con mayor número de genes fueron los relacionados con procesos de unión (GO:0005488), actividad catalítica (GO:0003824) y estructura molecular (GO:0005198) (Fig. 9).

La ontología de los genes expresados diferencialmente durante el punto de no retorno muestra que en la categoría de procesos biológicos los términos más representados fueron los involucrados con procesos celulares (GO:0009987) y metabólicos (GO:0008152) que incluye genes que participan en el metabolismo de carbohidratos (GO:0005975) y biosíntesis de ácidos grasos (GO:0006633), así como aquellos involucrados en el metabolismo de glucógeno (GO:0005977) y catabolismo de proteínas (GO:0030163). Se obtuvieron genes relacionados con la peroxidación de lípidos, dentro del término ontológico de respuesta a estrés oxidativo

(GO:0006979), así como aquellos relacionados con la metilación de histonas, dentro del término de respuesta a estímulos (GO:0050896). Mientras que dentro del término ontológico desarrollo, (GO:0032502) se encontraron genes relacionados con el desarrollo de la cutícula (Fig. 9).

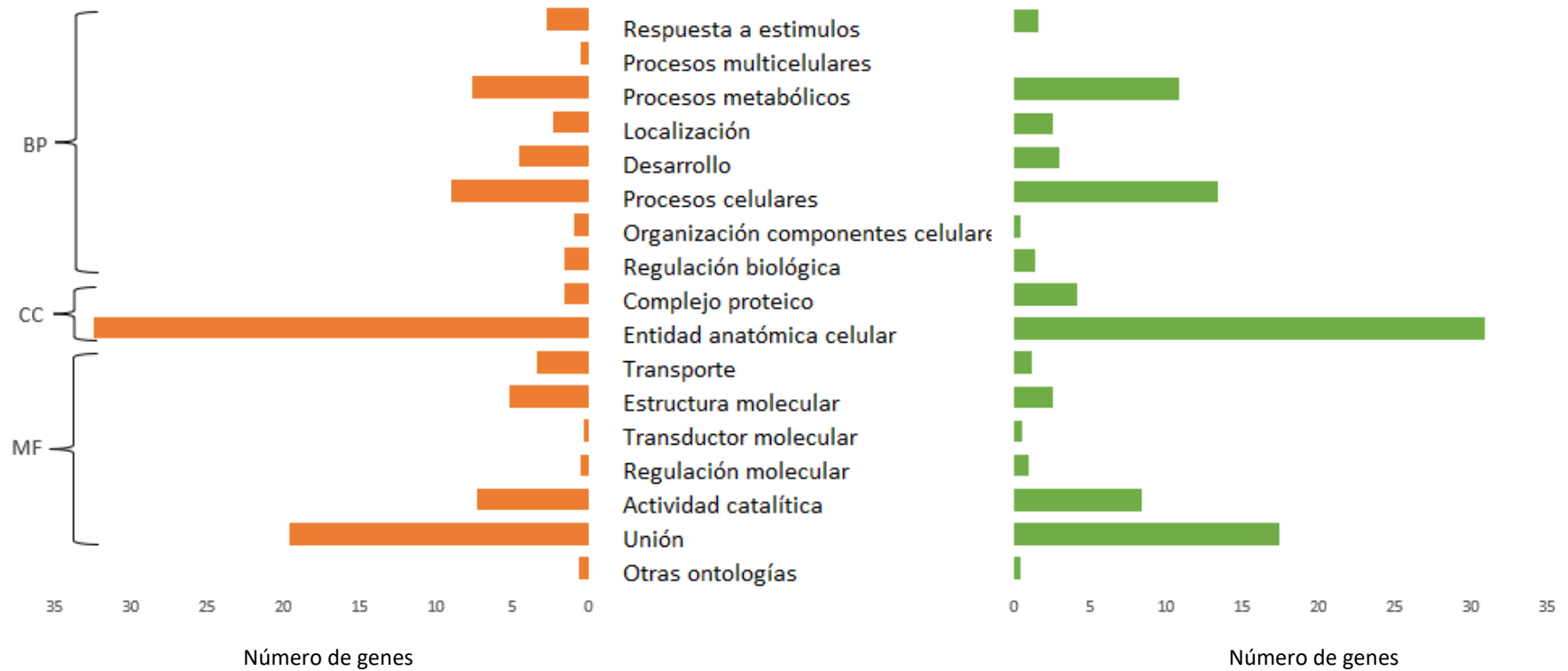


Figura 9. Ontología de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio (naranja) y punto de no retorno (verde) de *Penaeus vannamei* expuesto a 3 y 14 días de ayuno, respectivamente. BP: Proceso biológico; CC: Componente celular; MF: Función molecular.

El análisis de enriquecimiento demostró que durante el CC los términos biológicos más representados en la categoría de procesos biológicos (GO:0008150) fueron los involucrados con procesos metabólicos (GO:0008152) y celulares (GO:0009987). Así mismo, se observó una alta interacción entre los procesos relacionados con biosíntesis (GO:0044249), procesos del ciclo celular (GO:0000281) y organización de la estructura de actomiosina (GO:0031032) (Fig. 10).

Durante el punto de no retorno del camarón expuesto a 14 días de ayuno, los términos ontológicos mayormente representados también fueron aquellos relacionados con procesos metabólicos (GO:0008152) y celulares (GO:0009987). Se observó una mayor interacción entre los términos relacionados con procesos biosintéticos (GO:0009058) (Fig. 11).

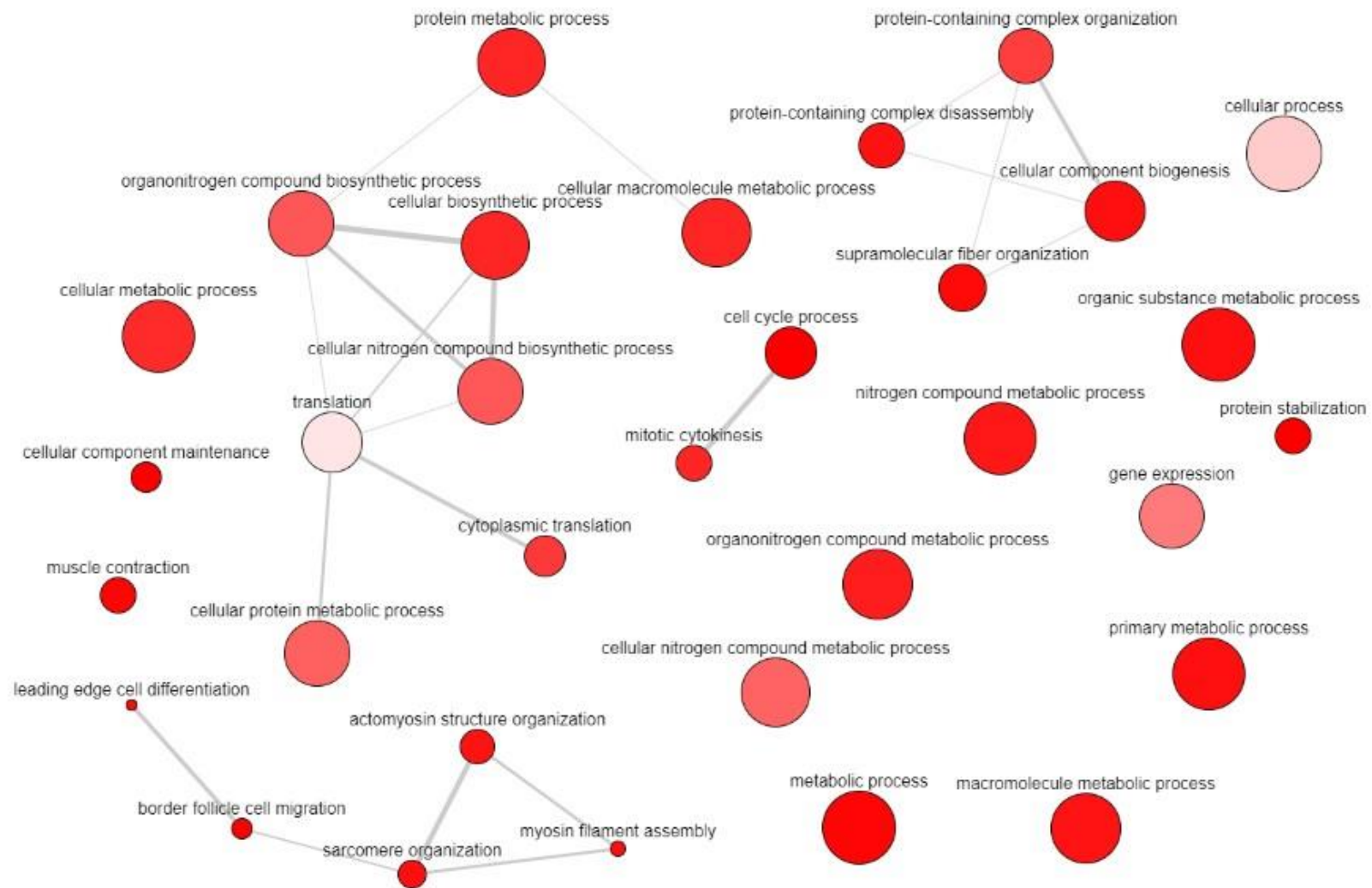


Figura 10. Procesos biológicos enriquecidos durante el crecimiento compensatorio de *Penaeus vannamei* inducido por ayuno temporal. El tamaño de la burbuja indica la frecuencia del término ontológico. El color representa la significancia del enriquecimiento; un color más claro indica un alto nivel de significancia. El grosor de las líneas indica el grado de similitud entre los términos ontológicos.

7.1.2.4 Validación de genes ED

De acuerdo con los resultados obtenidos con RefFinder, el gen de referencia más estable fue el EF1a (Anexo B) por lo que la expresión relativa de los genes expresados diferencialmente fue calculada con base en este gen. El cálculo de la expresión relativa mediante qPCR comprobó los resultados obtenidos en el análisis del transcriptoma y se observó la sobre-expresión significativa de los genes amilo-1,6 glucosidasa (*AGL*) ($p < 0.05$) y glutatión peroxidasa (*GPX4*) ($p < 0.05$) respecto al grupo control. Por otro lado, la expresión de los genes NAD quinasa (*nadk*) ($p < 0.01$) y proteína de unión al daño del ADN (*Ddb1*) ($p < 0.05$) fue menor que la de los organismos alimentados continuamente (Fig. 12).

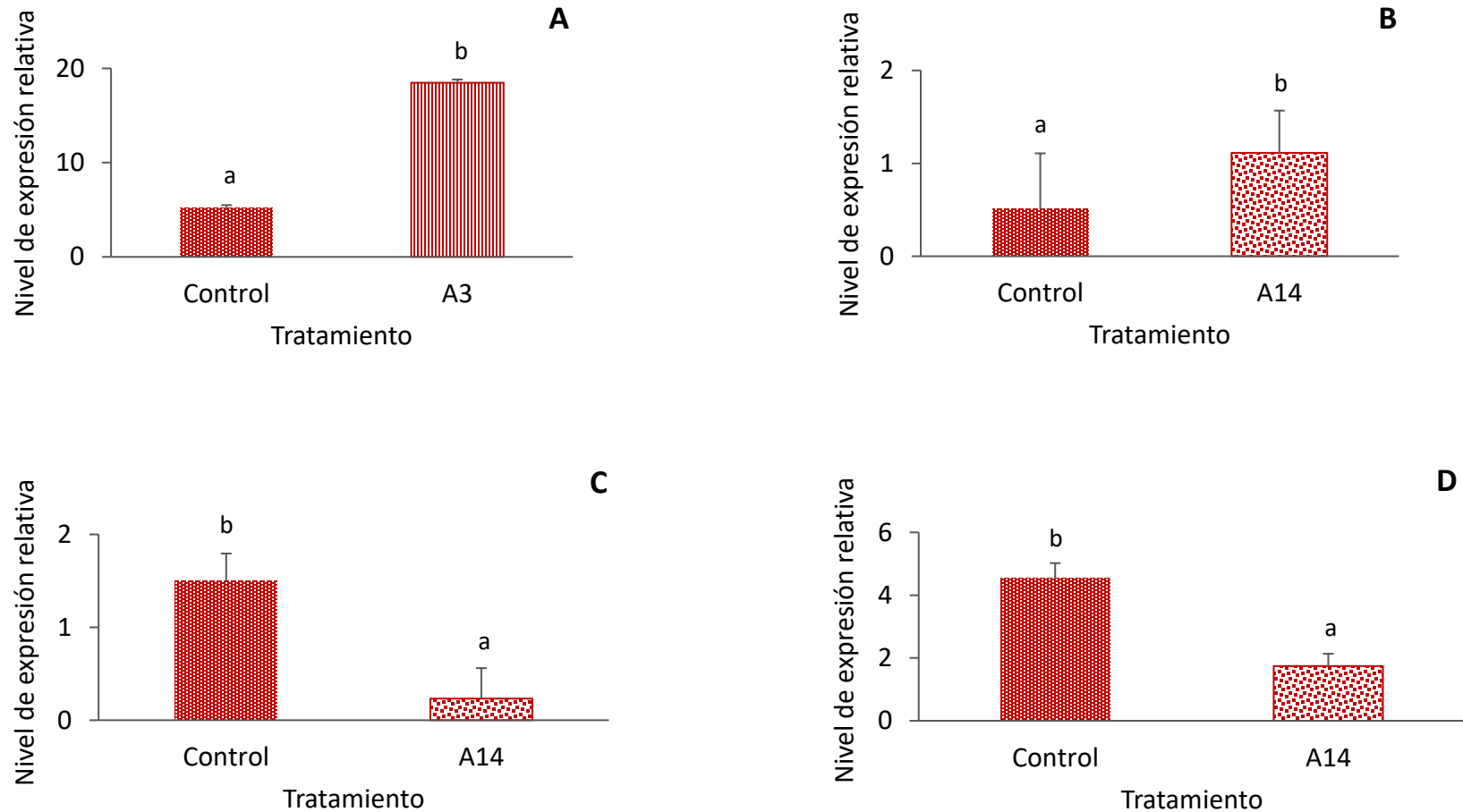


Figura 12. Nivel de expresión relativa de genes expresados diferencialmente en *Penaeus vannamei* expuesto a periodos de ayuno a 30°C. A) expresión del gen *AGL* durante el crecimiento compensatorio (A3) y de los genes B) *GPX4*, C) *nadk* y D) *Ddb1* durante el punto de no retorno (A14). Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.2 Bioensayo 2: Efecto del estrés temporal en *P. vannamei* inducido por temperatura

7.2.1 Rendimiento productivo y supervivencia

El mayor peso fue alcanzado con el tratamiento TA14, siendo significativo respecto al tratamiento TB14, que mostró el peso más bajo sin ser estadísticamente diferente de los tratamientos expuestos a estrés térmico por 7 días. Sin embargo, TA14 fue igual respecto al control (Tabla 10).

Tabla 10. Rendimiento productivo y supervivencia de *Penaeus vannamei* al cabo de 49 días posterior a la exposición temporal a condiciones de estrés por hipotermia (B=22°C) e hipertermia (A=32°C) durante 7 y 14 días.

Parámetro	Estrés (días)				
	Control (28°C)	7 (22°C/28°C)	7 (32°C/28°C)	14 (22°C/28°C)	14 (32°C/28°C)
	Control	TB7	TA7	TB14	TA14
PF	6.43 ± 0.48 ^b	5.41 ± 0.49 ^{ab}	6.27 ± 0.80 ^{ab}	5.09 ± 0.44 ^a	6.68 ± 0.27 ^b
GP (%)	1245 ± 45 ^b	1001 ± 100 ^a	1156 ± 139 ^{ab}	961 ± 77 ^a	1229 ± 29 ^b
TCE (% día ⁻¹)	5.30 ± 0.07 ^b	4.89 ± 0.19 ^a	5.16 ± 0.22 ^{ab}	4.82 ± 0.15 ^a	5.28 ± 0.04 ^b
CA (g/org)	12.3 ± 0.70 ^b	9.7 ± 0.04 ^a	14 ± 0.99 ^c	8.7 ± 0.52 ^a	13.8 ± 0.63 ^{bc}
FCA	2.1 ± 0.05 ^a	2 ± 0.19 ^a	2.4 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.14 ^a	2.2 ± 0.11 ^{ab}
S (%)	81 ± 11	78 ± 10	81 ± 5	81 ± 13	86 ± 13

Promedio ± desviación estándar. PF= peso final, GP= ganancia en peso, CA= consumo de alimento, FCA= factor de conversión alimenticia, S= supervivencia. TB7= 22°C por 7 días, TA7= 32°C por 7 días, TB14= 22°C por 14 días, TA14= 32°C por 14 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Respecto a la tasa de crecimiento específico total de los camarones expuestos a estrés térmico, el valor más alto se presentó en los camarones del tratamiento TA14, pero no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) comparado con el grupo control y el tratamiento TA7 (Tabla 10). No obstante, los organismos expuestos a hipertermia mostraron una mayor tasa de crecimiento que la del grupo control durante los primeros 7 días de estrés (TA7) (Fig. 13A), sin embargo, esta aceleración se normalizó a los 14 días (TB14) y no se encontraron diferencias con el grupo control (Fig. 13B); mientras que en los tratamientos evaluados a baja temperatura se observó un crecimiento disminuido durante los periodos de estrés térmico (Fig. 13 A, B).

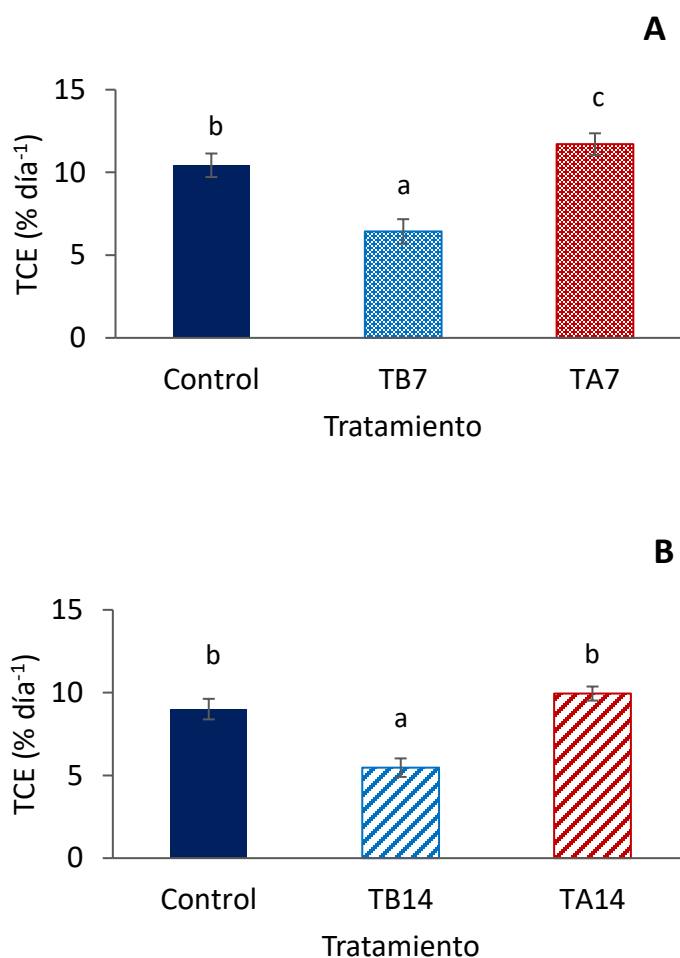


Figura 13. Tasa de crecimiento específico (% día⁻¹) de *Penaeus vannamei* durante exposición a estrés térmico durante A) 7 días y B) 14 días. TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Adicionalmente, los análisis demuestran que en los tratamientos expuestos a hipotermia, TB7 y TB14, los organismos presentaron crecimiento compensatorio asociado a una mayor TCE cuando la temperatura fue restablecida a 28°C, siendo más evidente los primeros 14 días posteriores al estrés para el tratamiento TB7 (Fig. 14A) y a partir del día 21 para el tratamiento expuesto a 14 días de baja temperatura (TB14) (Fig. 14B). Con base en este parámetro y el peso final alcanzado (Tabla 10) podemos establecer que los camarones expuestos a periodos de baja temperatura presentaron crecimiento compensatorio completo para el tratamiento TB7 y parcial para el tratamiento TB14.

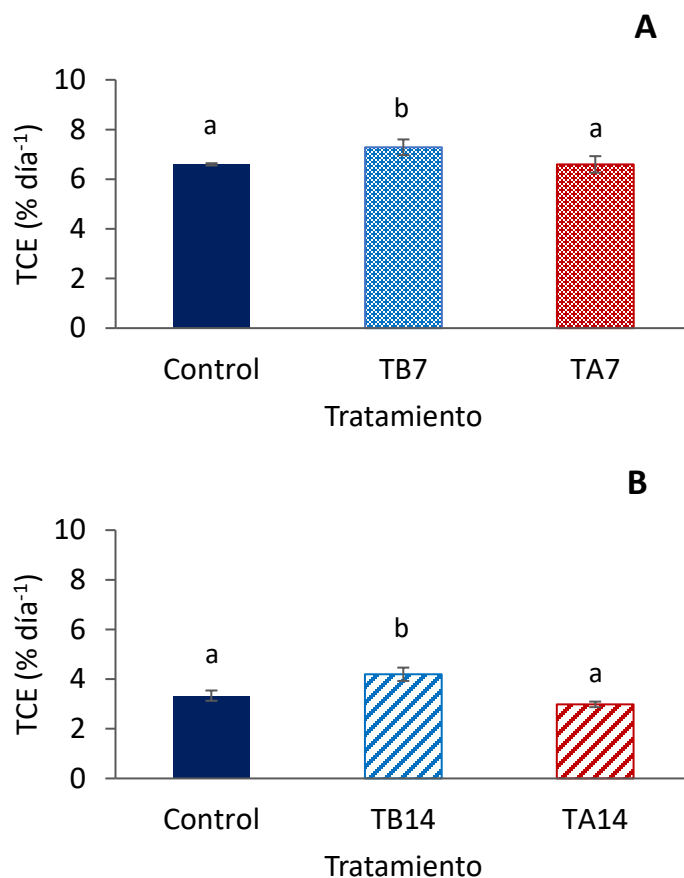


Figura 14. Tasa de crecimiento específico (% día⁻¹) de *Penaeus vannamei* entre A) los días 7 al 21 y B) los días 21 al 49 del periodo de recuperación a 28°C posterior al estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El grupo control presentó la mayor ganancia en peso (GP), seguido por el tratamiento TA14, mientras que el tratamiento TB14 presentó el porcentaje de GP más bajo. El consumo de alimento por organismo fue mayor en el tratamiento TA7 siendo significativo ($p < 0.05$) respecto al resto de los tratamientos excepto para el consumo observado en los organismos expuestos a hipertermia prolongada (TA14); los valores más bajos se observaron en los tratamientos expuestos a periodos de hipotermia, TB7 y TB14. Inclusive, de acuerdo con el factor de conversión alimenticia, la hipotermia indujo un mejor aprovechamiento de los nutrientes durante la etapa de recuperación comparado con los periodos de hipertermia. Los periodos de estrés térmico evaluados no afectaron la supervivencia de los organismos (Tabla 10).

7.2.2 Respuesta fisiológica en *P. vannamei* expuesto a estrés térmico temporal

Para este bioensayo se evaluó la respuesta fisiológica de todos los tratamientos y el grupo control durante la fase de recuperación a 28°C. Excepto el análisis de metilación de ADN que fue evaluado en las etapas de estrés y final, únicamente en el tratamiento seleccionado para la expresión de genes, TB14.

7.2.2.1 Actividad antioxidante

De acuerdo con los resultados obtenidos después de 7 días de estrés térmico y 14 días de recuperación, la actividad antioxidante no fue diferente en los tratamientos TB7 y TA7 respecto al grupo control (Figs. 15, 16 y 17). Sin embargo, la actividad superóxido dismutasa disminuyó significativamente durante el CC por efecto de la hipotermia prolongada (Fig. 15). Por el contrario, la actividad catalasa se incrementó significativamente ($p < 0.05$) en los camarones expuestos a 32°C por 14 días (Fig. 16) y la actividad GPx también fue mayor por la exposición al estrés térmico durante 14 días (Fig. 17).

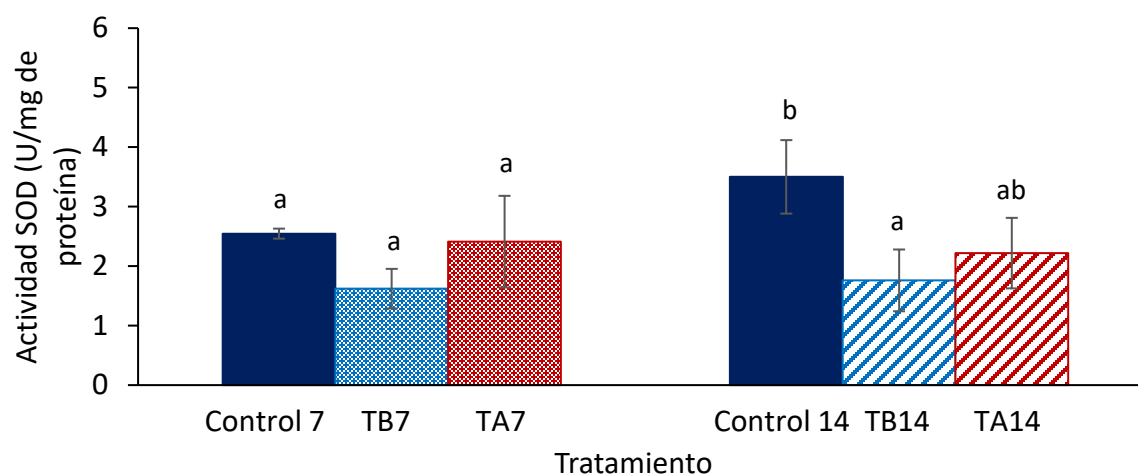


Figura 15. Actividad superóxido dismutasa en *Penaeus vannamei* al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos del mismo periodo de estrés.

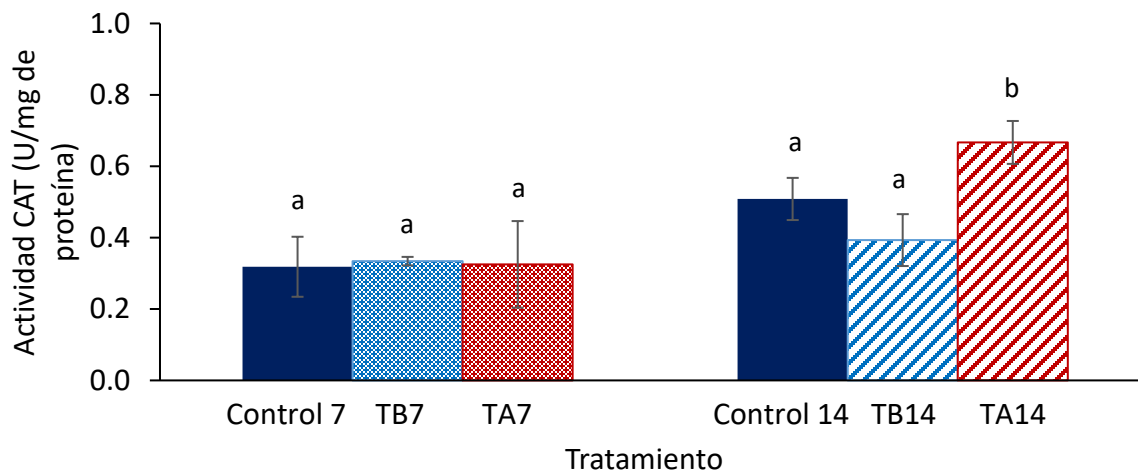


Figura 16. Actividad catalasa en *Penaeus vannamei* al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos del mismo periodo de estrés.

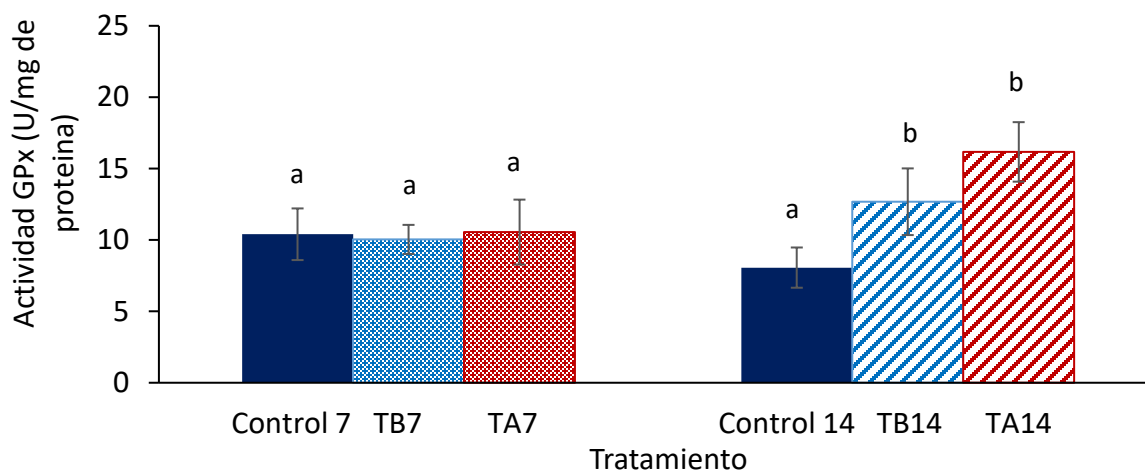


Figura 17. Actividad glutatión peroxidasa en *Penaeus vannamei* al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de estrés térmico: TB7= 22°C por 7 días; TA7= 32°C por 7 días; TB14= 22°C por 14 días; TA14= 32°C por 14 días. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos del mismo periodo de estrés.

7.2.2.2 Actividad enzimática digestiva

Los organismos expuestos a hipotermia por 7 días (TB7) presentaron una actividad lipasa significativamente mayor ($p < 0.05$) que el grupo control a los 14 días de recuperación a 28°C, mientras que los camarones expuestos a hipertermia por el mismo periodo (TA7) mostraron mayor actividad lipasa y quimotripsina ($p < 0.05$) (Tabla 11).

Un periodo prolongado de estrés térmico redujo significativamente la actividad amilasa, y se observó que la actividad lipasa disminuyó más por la hipertermia que por hipotermia. La actividad de las proteasas también se modificó por el periodo prolongado de estrés (14 días), siendo la actividad quimotripsina significativamente mayor para los organismos en crecimiento compensatorio expuestos a hipotermia (TB14) y la actividad tripsina para los que fueron expuestos a hipertermia (TA14) (Tabla 11).

Tabla 11. Actividad específica de enzimas digestivas (U/ μ g de proteína) en *P. vannamei* al día 14 de recuperación a 28°C, después de periodos temporales de hipotermia a 22°C e hipertermia a 32°C.

Días de estrés	Actividad	Tratamiento		
		Control (28°C)	TB7 (22°C)	TA7 (32°C)
7	Tripsina	40 \pm 2	41 \pm 3	38 \pm 2
	Quimotripsina	58 \pm 5 ^a	56 \pm 5 ^a	89 \pm 5 ^b
	Lipasa	5 \pm 0.2 ^a	7 \pm 0.1 ^b	8 \pm 0.4 ^c
	Amilasa	0.7 \pm 0.02	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
14		Control (28°C)	TB14 (22°C)	TA14 (32°C)
	Tripsina	30 \pm 2 ^a	31 \pm 1 ^a	36 \pm 2 ^b
	Quimotripsina	41 \pm 5 ^a	68 \pm 8 ^b	44 \pm 8 ^a
	Lipasa	10 \pm 0.1 ^c	8 \pm 0.5 ^b	6 \pm 0.5 ^a
	Amilasa	0.7 \pm 0.1 ^b	0.6 \pm 0.1 ^a	0.6 \pm 0.03 ^a

Media \pm desviación estándar. TB7= 22°C por 7 días, TA7= 32°C por 7 días, TB14= 22°C por 14 días, TA14= 32°C por 14 días. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

7.2.2.3 Composición bioquímica en tejidos de reserva

Los organismos expuestos a 22°C por 7 días (TB7), presentaron una mayor concentración de glucógeno en músculo (Tabla 12) y hepatopáncreas (Tabla 13), así como un nivel de proteínas y lípidos en hepatopáncreas significativamente mayor ($p<0.05$) respecto al grupo control. Sin embargo, se observó una menor concentración de glucosa en hepatopáncreas. Por otro lado, la hipotermia prolongada (TB14) indujo una mayor concentración de triglicéridos en hemolinfa durante el crecimiento compensatorio (Tabla 14).

En cuanto a los camarones expuestos a hipertermia por 7 días (TA7), se observó una menor concentración de glucosa en hepatopáncreas, pero un mayor nivel de este compuesto en hemolinfa, así como del contenido de lípidos en hepatopáncreas durante la fase de recuperación a 28°C. Mientras que en los camarones expuestos a hipertermia prolongada (TA14), el nivel de glucógeno en músculo y hepatopáncreas, así como el de lípidos en hepatopáncreas fue significativamente menor ($p<0.05$) respecto al observado en los organismos del grupo control. Por el contrario, el nivel de glucosa en hepatopáncreas, así como el de proteínas y triglicéridos en hemolinfa fue mayor después de 14 días a 32°C y 14 días a 28°C (Tablas 12, 13 y 14).

Tabla 12. Concentración de compuestos metabólicos en el músculo de *Penaeus vannamei* a los 49 días, durante la fase de recuperación a 28°C, después de haber sido expuesto a periodos con diferentes temperaturas.

Compuesto	7 días de estrés			14 días de estrés		
	28°C	22°C	32°C	28°C	22°C	32°C
	Control 7	TB7	TA7	Control 14	TB14	TA14
Proteínas (mg/g)	616 ± 32	604.3 ± 45.7	657.7 ± 72.8	552.2 ± 68.5	566.4 ± 68.3	581 ± 44.4
Glucógeno (mg/g)	11.3 ± 2.2 ^a	17.5 ± 1.7 ^b	8.95 ± 0.97 ^a	10.8 ± 2.6 ^b	12 ± 1.9 ^b	6.8 ± 1.3 ^a
Lactato (mg/g)	2.2 ± 0.3	1.98 ± 0.4	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.6	2.2 ± 0.4	2.1 ± 0.8

Valor promedio ± desviación estándar. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos del mismo periodo de estrés ($p < 0.05$).

Tabla 13. Concentración de compuestos metabólicos en el hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* a los 49 días, durante la fase de recuperación a 28°C, después de haber sido expuesto a periodos con diferentes temperaturas.

Compuesto	7 días de estrés			14 días de estrés		
	28°C	22°C	32°C	28°C	22°C	32°C
	Control 7	TB7	TA7	Control 14	TB14	TA14
Proteínas (mg/g)	263.1 ± 7.8 ^a	364.4 ± 40.8 ^b	329.8 ± 41.4 ^{ab}	297.9 ± 64.3	271.9 ± 35.7	290.8 ± 52.2
Glucosa (mg/g)	118.2 ± 18.2 ^b	64.2 ± 16.5 ^a	78.3 ± 19.8 ^a	102.1 ± 4.6 ^a	97.6 ± 15.6 ^a	133.8 ± 9.7 ^b
Glucógeno (mg/g)	7.9 ± 3.8 ^a	19.4 ± 2.9 ^b	5.8 ± 1.4 ^a	4.9 ± 0.9 ^b	4.7 ± 0.8 ^b	2.3 ± 0.8 ^a
Lípidos (mg/g)	245.1 ± 16.8 ^a	294.3 ± 27.5 ^b	448.6 ± 16.8 ^c	214.4 ± 14.3 ^b	259.8 ± 40 ^b	132.5 ± 22.3 ^a
Triglicéridos (mg/g)	52.2 ± 1.8	56.6 ± 4.8	50.9 ± 15	60.4 ± 11.9	57.7 ± 10.4	64.9 ± 8.4
Colesterol (mg/g)	6.6 ± 0.8	5.8 ± 1.3	8.1 ± 1.6	5.7 ± 1.3	4.5 ± 1.5	5.9 ± 2.1

Valor promedio ± desviación estándar. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos del mismo periodo de estrés ($p < 0.05$).

Tabla 14. Concentración de compuestos metabólicos en la hemolinfa de *Penaeus vannamei* a los 49 días, durante la fase de recuperación a 28°C, después de haber sido expuesto a periodos con diferentes temperaturas.

Compuesto	7 días de estrés			14 días de estrés		
	28°C	22°C	32°C	28°C	22°C	32°C
	Control	TB7	TA7	Control	TB14	TA14
Proteínas (mg/mL)	80.4 ± 9.4	74.1 ± 5.7	80.4 ± 8.8	58.7 ± 6.8 ^a	63.2 ± 6.6 ^a	83.2 ± 7.7 ^b
Glucosa (mg/mL)	0.18 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.3 ^a	0.26 ± 0.04 ^b	0.17 ± 0.03	0.17 ± 07	0.19 ± 0.06
Lactato (mg/mL)	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.02
Triglicéridos (mg/mL)	1.20 ± 0.4	1.05 ± 0.1	1.06 ± 0.22	0.74 ± 0.12 ^a	1.10 ± 0.2 ^b	1.44 ± 0.15 ^c

Valor promedio ± desviación estándar. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos del mismo periodo de estrés ($p < 0.05$).

7.2.2.4 Metilación global del ADN

El análisis demostró que la hipotermia prolongada (TB14) no modificó significativamente la metilación global de ADN en el camarón (Fig. 18).

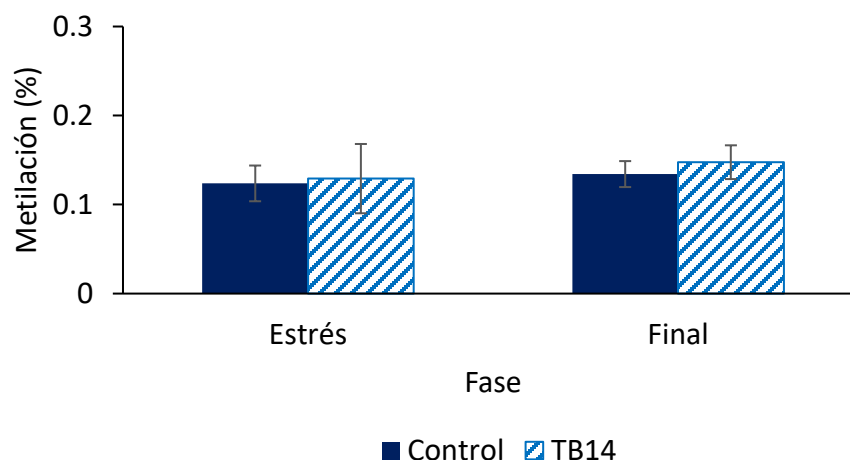


Figura 18. Porcentaje de metilación global en *Penaeus vannamei* durante la fase de estrés inducido por hipotermia prolongada a 22°C y durante la fase final de recuperación a 28°C.

7.2.3 Expresión de genes durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei* inducido por hipotermia

De acuerdo con los resultados zootécnicos obtenidos y la TCE observada durante el periodo de recuperación a 28°C, se seleccionó el tratamiento TB14 y su control para el análisis de expresión diferencial de genes durante el crecimiento compensatorio inducido por hipotermia prolongada.

7.2.3.1 Análisis bioinformático

El porcentaje de alineamiento de las secuencias al genoma de *P. vannamei* fue de aproximadamente el 85% en todas las muestras (Tabla 15).

Tabla 15. Número de lecturas de las bibliotecas genómicas secuenciadas a partir muestras de hepatopáncreas del bioensayo (2) de variación térmica y porcentaje de alineamiento al genoma de referencia de camarón blanco *Penaeus vannamei*

Condición	Muestra	Número de lecturas	Alineamiento (%)
Tratamiento	TB14a	22'995,462	84.72
	TB14b	22'536,465	85.80
	TB14c	20'522,832	85.79
Control	CTB14a	20'614,185	85.80
	CTB14b	21'074,940	85.87
	CTB14c	27'085,555	86.04

El ensamble de transcritos mostró un porcentaje de expresión de nuevos exones del 16% (Tabla 16).

Tabla 16. Estadísticas del ensamble de transcritos de las bibliotecas del bioensayo (2) de variación térmica

Exones faltantes:	0 / 151856	(0.0 %)
Nuevos exones:	31399 / 196443	(16 %)
Intrones faltantes:	0 / 126329	(0.0 %)
Intrones nuevos:	14752 / 149146	(9.9 %)
Loci faltantes:	0 / 25527	(0.0 %)
Nuevos loci:	10875 / 36131	(30.1 %)

7.2.3.2 Expresión diferencial de genes

Al comparar la expresión de genes durante el crecimiento compensatorio inducido por hipotermia respecto a la del grupo control, se encontró un total de 544 genes expresados diferencialmente. El número de genes sobre-expresados y subexpresados fue calculado de acuerdo con el valor fold change ($fc < 1 =$ subexpresión; $fc > 1 =$ sobre-expresión) (Tabla 17).

Tabla 17. Número de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei* expuesto a hipotermia (22°C) durante 14 días.

Número de genes:	Muestra TB14
Genes expresados diferencialmente (ED)	544
Genes únicos	493
Genes anotados	439
Genes sobre-expresados	152
Genes subexpresados	287

Del total de genes anotados, el 89% fue incluido en la categoría de función molecular, el 86.7% en la de componentes celulares y el 83.3% dentro de la categoría de procesos biológicos (Anexo C). Dentro de la categoría de procesos biológicos, se encontró la sobre-expresión de genes relacionados con procesos metabólicos (GO:0008152), procesos celulares (GO:0009987) y de respuesta a estímulos (GO:0050896) que involucra algunos genes relacionados la respuesta inmune. Por el contrario, dentro de la categoría de función molecular se subexpresaron genes relacionados la actividad GPx, así como aquellos relacionados con la obtención de energía dentro del término de procesos metabólicos (GO:0008152), o con el crecimiento dentro del término de procesos de desarrollo (GO:0032502), entre otros, en la categoría de procesos biológicos.

El análisis de enriquecimiento demostró que los términos más representados durante el CC inducido por hipotermia son lo que presentan actividad de unión al ATP (GO:0005524), al ADN (GO:0003677) y ARN (GO:0003723), actividad transferasa (GO:0016740), así como aquellos relacionados con la composición del núcleo (GO:0005634) y la membrana (GO:0016020), y con procesos metabólicos de lípidos (GO:0006629), donde se incluyen genes que codifican para la enzima acetil CoA sintetasa y la lipasa inhibidora de la digestión de triglicéridos (PNLIPRP1). Mientras que los términos menos representados, pero altamente significativos son los involucrados con actividad factor de elongación (GO:0003746), actividad acetil CoA deshidrogenasa (GO:0003995), así como los relacionados con la composición de la membrana mitocondrial (GO:0005743). Por otra parte, se observó mayor interacción entre los términos biológicos involucrados en la liberación de citocromo c a la mitocondria (GO:0001836) y el índice de regulación del corazón (GO:0002027); entre los términos involucrados con actividad GTPasa

(GO:0005096) y el intercambio guanil nucleósido (GO:0005085), así como entre los constituyentes del complejo proteína-fosfatasa tipos 1 (GO:0000164) y 2A (GO:0000159) (Fig. 19).

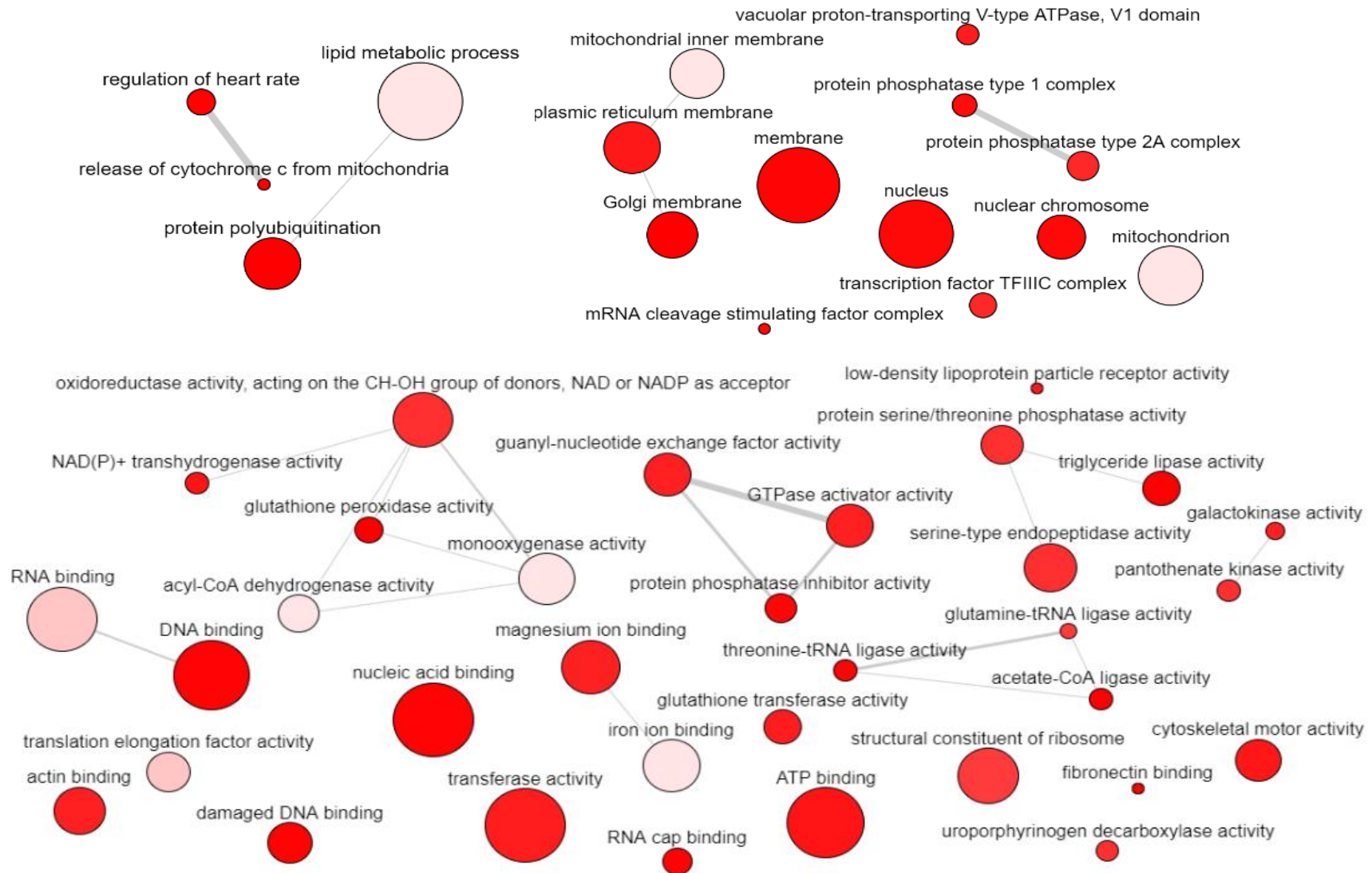


Figura 19. Términos enriquecidos durante el crecimiento compensatorio de *Penaeus vannamei* inducido por hipotermia. El tamaño de la burbuja indica la frecuencia del término ontológico. El color representa la significancia del enriquecimiento; un color más claro indica un alto nivel de significancia. El grosor de las líneas indica el grado de similitud entre los términos ontológicos.

7.3 Bioensayo 3: Efecto del estrés temporal en *P. vannamei* inducido por alta densidad de cultivo

7.3.1 Crecimiento y supervivencia de *P. vannamei* expuesto a alta densidad de cultivo

La cinética de crecimiento obtenida durante las 7 semanas experimentales demostró que los camarones expuestos a alta densidad de cultivo durante 14 días alcanzaron un peso similar al de los organismos del grupo control presentando crecimiento compensatorio completo, mientras que los organismos bajo un periodo prolongado de alta densidad (D21) presentaron crecimiento compensatorio parcial (Fig. 20).

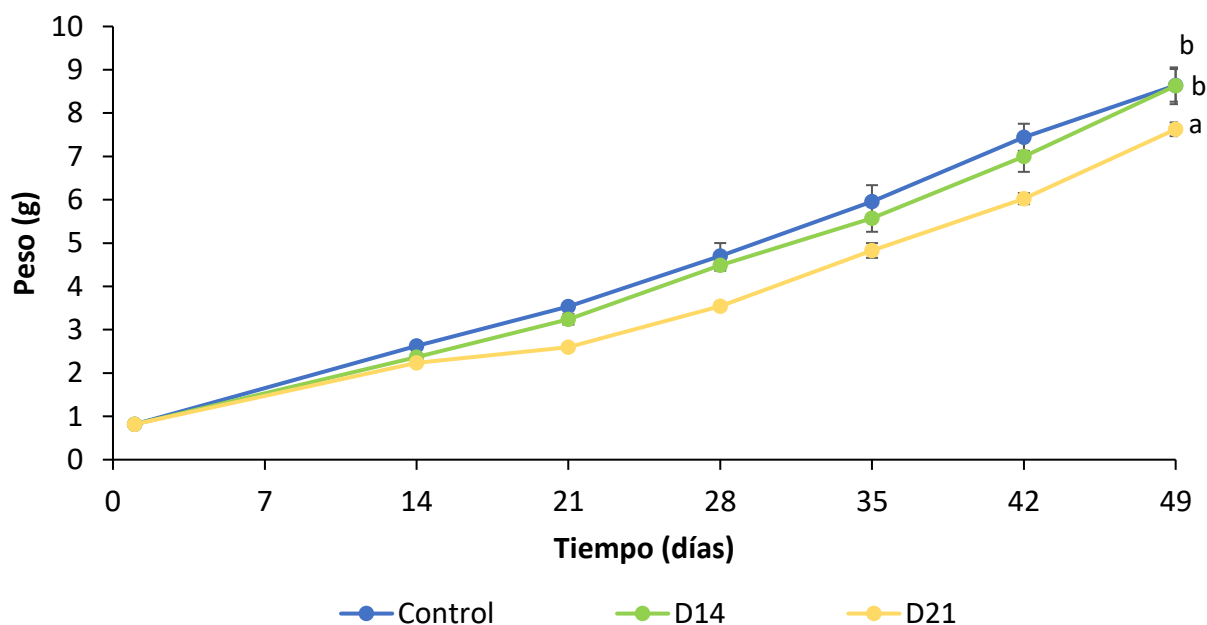


Figura 20. Cinética de crecimiento de *P. vannamei* expuesto a periodos de alta densidad de cultivo (1100 org/m^3) durante 14 (D14) y 21 días (D21) seguidos de un periodo de recuperación con densidad óptima (220 org/m^3) durante 35 y 28 días, respectivamente, comparada con la de organismos cultivados en densidad óptima constante (220 org/m^3). Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Esta tendencia también fue observada entre los tratamientos y el grupo control respecto a la ganancia en peso (GP) y tasa de crecimiento específico (TCE). El consumo de alimento y el factor de conversión alimenticia (FCA) no fueron afectados por los periodos de alta densidad de cultivo. Sin embargo, en el grupo expuesto a esta condición por 21 días (D21), la tendencia a consumir menos alimento y el incremento en el factor de conversión alimenticia. De igual manera, los

periodos de alta densidad de organismos no afectaron el porcentaje de supervivencia final; sin embargo, se observó una tendencia a mayor supervivencia en los grupos expuestos a estrés, sin afectar el porcentaje de biomasa final obtenida respecto al grupo control (Tabla 18).

Tabla 18. Rendimiento productivo y supervivencia de *Penaeus vannamei* a 49 días de cultivo después de la exposición a periodos temporales de alta densidad de cultivo (1100 org/m³) durante 14 y 21 días de cultivo.

Parámetro	Tratamiento		
	Control	D14	D21
GP (%)	956.4 ± 49 ^b	957.8 ± 52 ^b	831.8 ± 19 ^a
TCE (% día ⁻¹)	4.8 ± 0.10 ^b	4.8 ± 0.10 ^b	4.6 ± 0.04 ^a
CA (g/org)	13.1 ± 0.72	13.2 ± 0.12	12.5 ± 0.08
FCA	1.7 ± 0.10	1.7 ± 0.13	1.8 ± 0.04
S (%)	90 ± 4	94 ± 5	95 ± 3
Biomasa (g)	90 ± 8	97 ± 9	89 ± 5

Peso promedio ± desviación estándar. GP= ganancia en peso, TCE= tasa de crecimiento específico, CA= consumo de alimento, FCA= factor de conversión alimenticia, S= supervivencia. D14= 14 días en alta densidad y 35 días de recuperación con densidad óptima, D21= 21 días en alta densidad y 28 días de recuperación con densidad óptima. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

7.3.2 Respuesta fisiológica en *P. vannamei* inducida por la alta densidad de cultivo

Para este bioensayo se evaluó la respuesta fisiológica del camarón expuesto a 14 días de alta densidad (D14) considerando las tres etapas experimentales: estrés, crecimiento compensatorio y final del periodo experimental.

7.3.2.1 Actividad antioxidante por efecto de la alta densidad

La actividad superóxido dismutasa (SOD) durante la fase de estrés fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los organismos mantenidos durante 14 días en alta densidad (D14), sin embargo, en las fases de crecimiento compensatorio y final, no se observaron diferencias respecto al grupo control (Fig. 21).

La actividad catalasa (CAT) también fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento D14 durante la fase de estrés, pero disminuyó significativamente durante el crecimiento

compensatorio ($p < 0.05$). Al final del bioensayo no se detectaron diferencias en la actividad de esta enzima entre ambos grupos (Fig. 22).

La actividad GPx no fue alterada significativamente en ninguna de las fases evaluadas (Fig. 23).

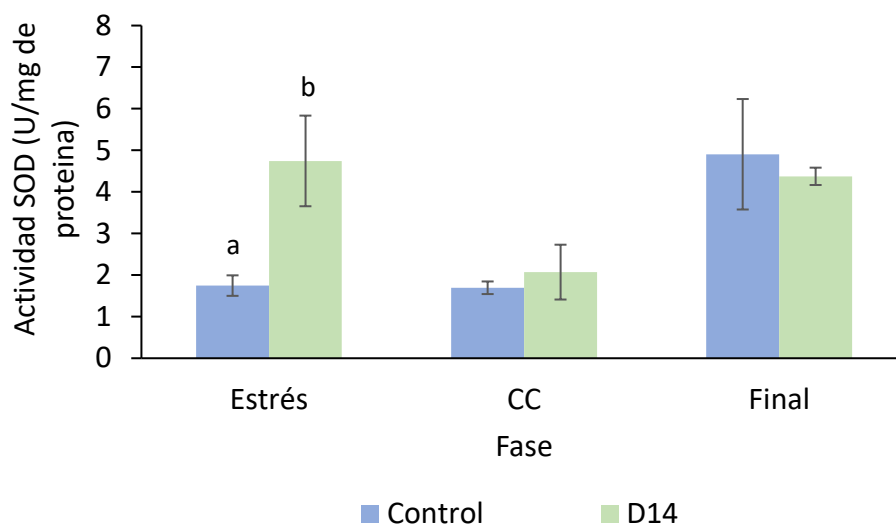


Figura 21. Actividad superóxido dismutasa en *Penaeus vannamei* a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días con alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en cada fase.

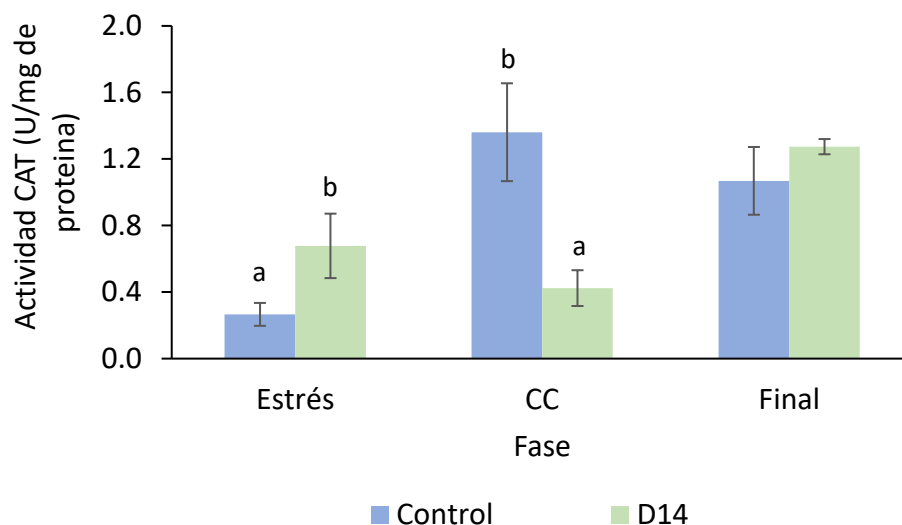


Figura 22. Actividad catalasa en *Penaeus vannamei* a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días con alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en cada fase.

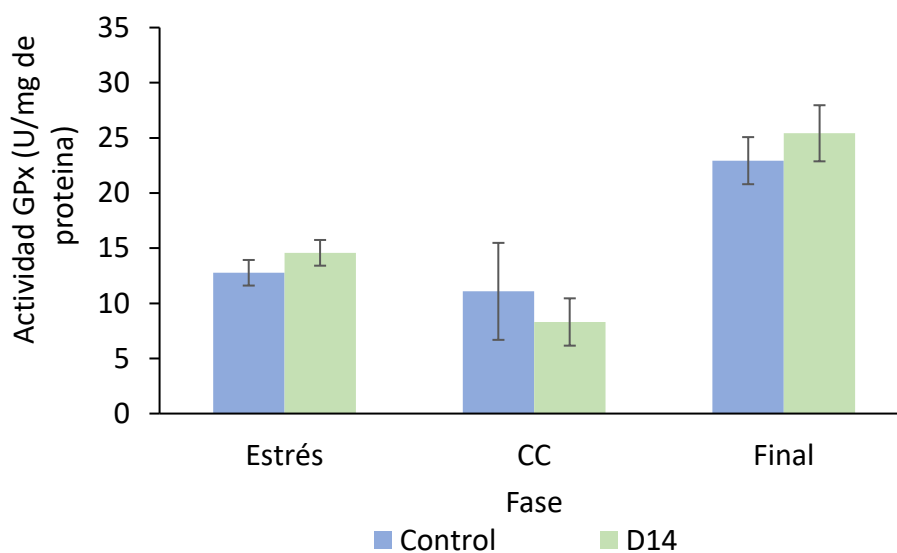


Figura 23. Actividad glutatión peroxidasa en *Penaeus vannamei* a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días con alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio.

7.3.2.2 Actividad enzimática digestiva en el camarón blanco expuesto a alta densidad

Durante la fase de estrés por alta densidad, el camarón incrementó significativamente la actividad de las proteasas, tripsina y quimotripsina (Figs. 24 y 25). Mientras que en la fase de crecimiento compensatorio la actividad quimotripsina y lipasa fueron las de mayor actividad en D14 (Figs. 25 y 26). En la etapa final del periodo experimental, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en la actividad de las enzimas digestivas respecto al grupo control. La actividad amilasa no se vio afectada por la alta densidad de cultivo ni por el cambio a densidad óptima (Fig. 27).

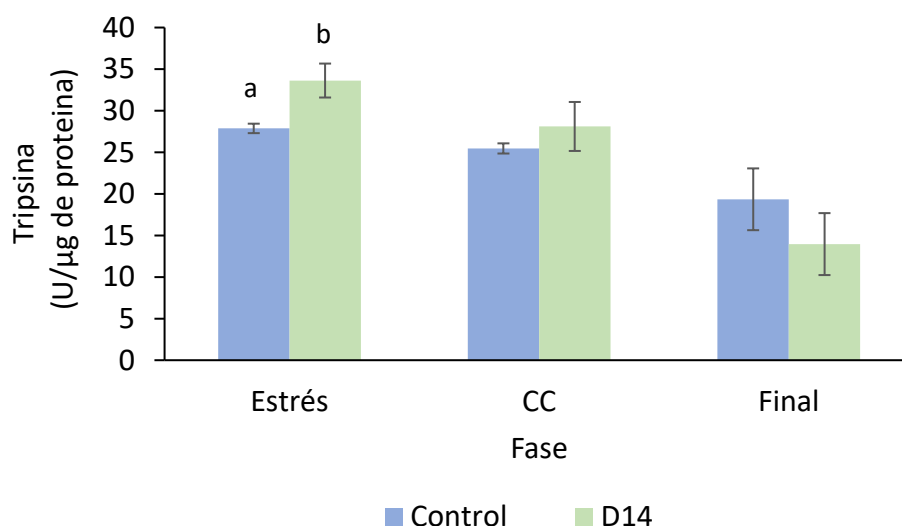


Figura 24. Actividad tripsina en *Penaeus vannamei* a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días con alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos en cada fase.

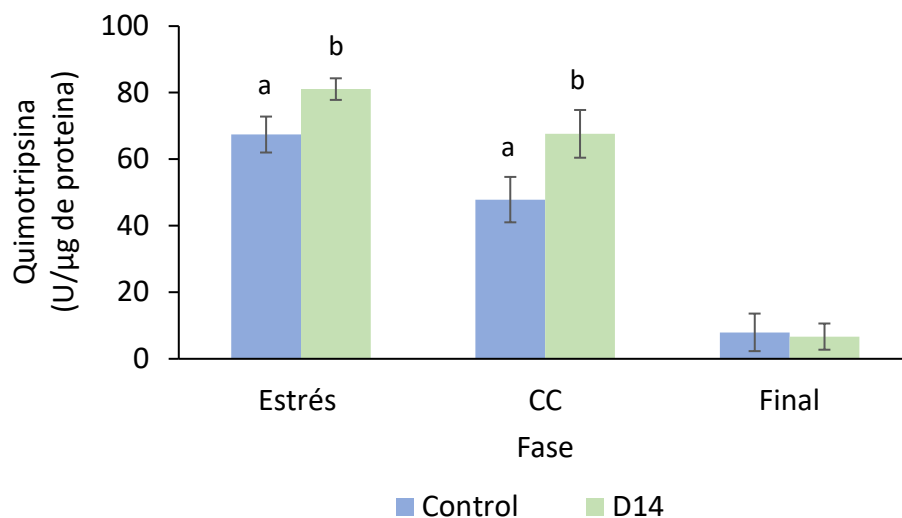


Figura 25. Actividad quimotripsina en *Penaeus vannamei* a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días con alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en cada fase.

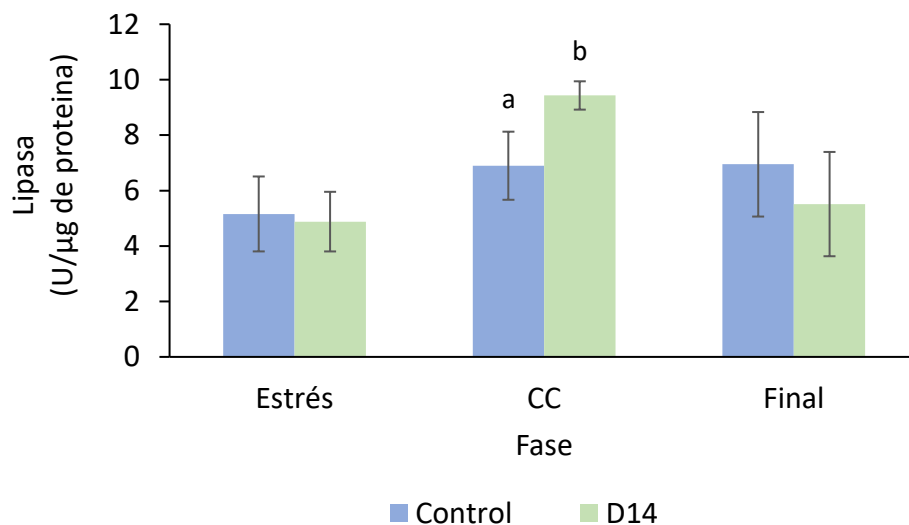


Figura 26. Actividad lipasa en *Penaeus vannamei* a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días con alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en cada fase.

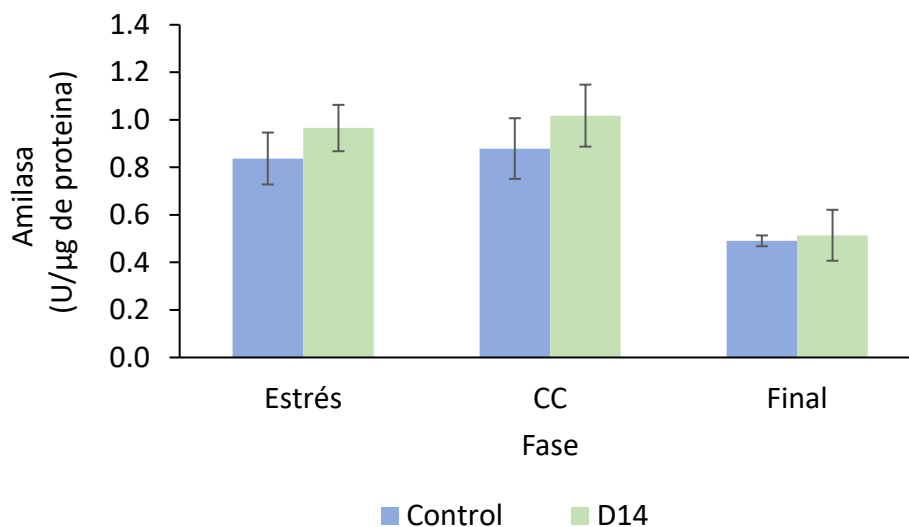


Figura 27. Actividad amilasa en *Penaeus vannamei* a los 14 días de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días con alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio.

7.3.2.3 Compuestos metabólicos en tejidos de reserva

En el músculo del camarón se observó una reducción de glucógeno y un incremento de lactato en la etapa final, después de 35 días en densidad óptima (Tabla 19).

En hepatopáncreas se encontró mayor concentración de proteínas durante la fase de estrés. Al día 7 de la etapa de recuperación, es decir, durante el crecimiento compensatorio se observó una mayor concentración de triglicéridos y una baja concentración en el contenido de proteínas, colesterol y glucógeno. Un bajo nivel de glucógeno también fue observado en la etapa final (Tabla 20).

En la hemolinfa el contenido de proteínas, lactato y triglicéridos se redujo significativamente ($p < 0.05$) durante la fase de estrés. Por el contrario, durante el crecimiento compensatorio el nivel de triglicéridos fue mayor que en el grupo control, así como el nivel de glucosa en la etapa final del bioensayo (Tabla 21).

Tabla 19. Concentración de compuestos metabólicos en el músculo de *Penaeus vannamei* durante y después de la exposición a alta densidad de cultivo (1100 org/m³), comparados con un grupo control mantenido en densidad de cultivo óptima (220 org/m³).

Compuesto	Estrés		Crecimiento compensatorio		Final	
	Control	D14	Control	D14	Control	D14
Proteínas (mg/g)	555.8 ± 38.2	559.5 ± 39.7	547.6 ± 27	576.3 ± 17.6	570.2 ± 34.8	565.6 ± 25.4
Glucógeno (mg/g)	10.48 ± 3.52	13.5 ± 2.9	8.7 ± 3.22	9.8 ± 2.4	12.1 ± 2.21 ^b	6.5 ± 2.27 ^a
Lactato (mg/g)	2.1 ± 0.5	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.09	1.8 ± 0.5 ^a	2.5 ± 0.2 ^b

Valores promedio ± desviación estándar. D14= 14 días en alta densidad y 35 días de recuperación con densidad óptima. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada fase ($p < 0.05$).

Tabla 20. Concentración de compuestos metabólicos en el hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* durante y después de la exposición a alta densidad de cultivo (1100 org/m³), comparados con un grupo control mantenido en densidad de cultivo óptima (220 org/m³).

Compuesto	Estrés		Crecimiento compensatorio		Final	
	Control	D14	Control	D14	Control	D14
Proteínas (mg/g)	325.9 ± 22.4 ^a	499.6 ± 71.7 ^b	425.9 ± 59.2 ^b	339.6 ± 24 ^a	322.7 ± 48	329.2 ± 33.9
Glucosa (mg/g)	125.7 ± 14	118.5 ± 2.8	144.1 ± 8.08	122.8 ± 25.2	131.5 ± 11.5	118.2 ± 11.04
Glucógeno (mg/g)	4.3 ± 1.4	4.4 ± 1.4	8.7 ± 1.8 ^b	4.9 ± 1.1 ^a	13.3 ± 3.4 ^b	6.5 ± 0.9 ^a
Lípidos (mg/g)	205.9 ± 45.1	154.9 ± 53.98	83.4 ± 7.8	91.7 ± 4.3	101.6 ± 11.7	108.9 ± 21.2
Triglicéridos (mg/g)	80.9 ± 13.2	75.4 ± 2.8	66.8 ± 4.49 ^a	90.1 ± 4.45 ^b	87.4 ± 4.9	76 ± 11.2
Colesterol (mg/g)	9.5 ± 1.8	11.2 ± 1.7	17 ± 5 ^b	8.1 ± 0.6 ^a	7.2 ± 0.8	8.1 ± 1.2

Valores promedio ± desviación estándar. D14= 14 días en alta densidad y 35 días de recuperación con densidad óptima. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada fase ($p < 0.05$).

Tabla 21. Concentración de compuestos metabólicos en la hemolinfa de *Penaeus vannamei* durante y después de la exposición a alta densidad de cultivo (1100 org/m³), comparados con un grupo control mantenido en densidad de cultivo óptima (220 org/m³).

Compuesto	Estrés		Crecimiento compensatorio		Final	
	Control	D14	Control	D14	Control	D14
Proteínas (mg/mL)	67.6 ± 7 ^b	51.8 ± 2 ^a	63.2 ± 2.9	56.7 ± 8.6	89.3 ± 9.1	81.9 ± 4.8
Glucosa (mg/mL)	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.03 ^b
Lactato (mg/mL)	0.06 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Triglicéridos (mg/mL)	0.5 ± 0.06 ^b	0.32 ± 0.03 ^a	0.44 ± 0.03 ^a	0.59 ± 0.15 ^b	1 ± 0.18	0.89 ± 0.23

Valores promedio ± desviación estándar. D14= 14 días en alta densidad y 35 días con densidad óptima. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada fase ($p < 0.05$).

7.3.2.4 Estado bioenergético del camarón por efecto de la alta densidad

En la fase de estrés por densidad elevada se observó una menor concentración de ácido úrico y adenosin monofosfato (AMP) en el músculo del camarón, sin embargo, se incrementó la concentración de hipoxantina, xantina y adenosin trifosfato (ATP) comparado con los niveles encontrados en el grupo control. Así mismo, durante el CC además de la alta concentración de ATP, el nivel de ácido úrico y adenosin se incrementó significativamente ($p < 0.05$). En cambio, en la etapa final se observó una reducción significativa en la concentración de xantina y adenosin difosfato (ADP) ($p < 0.05$) a diferencia del nivel de adenosin, el cual se mantuvo por encima del observado en el grupo control (Tabla 22).

El contenido energético celular, medido a través de la carga energética adenílica (CEA), fue mayor en el tratamiento D14 durante la fase de estrés y crecimiento compensatorio respecto al grupo control, sin embargo, al día 35 de recuperación a densidad de cultivo óptima, la CEA entre ambos grupos no presentó diferencias significativas (Fig. 28).

Por otra parte, la concentración de arginin fosfato fue mayor sólo cuando el camarón se mantuvo en densidad elevada presentando por el contrario una disminución significativa respecto al grupo control al finalizar el periodo experimental (Fig. 29).

Tabla 22. Concentración de nucleótidos adenílicos en el músculo del camarón blanco *P. vannamei* durante un periodo de estrés inducido por alta densidad de cultivo (1100 org/m³), crecimiento compensatorio y fase de recuperación a densidad de cultivo óptima (220 org/m³).

Nucleótido	Estrés		Crecimiento compensatorio		Final	
	Control ($\mu\text{mol/g}$)	D14 ($\mu\text{mol/g}$)	Control ($\mu\text{mol/g}$)	D14 ($\mu\text{mol/g}$)	Control ($\mu\text{mol/g}$)	D14 ($\mu\text{mol/g}$)
Hipoxantina	0.02 \pm 0.008 ^a	0.04 \pm 0.0011 ^b	0.03 \pm 0.013	0.05 \pm 0.009	0.02 \pm 0.006	0.02 \pm .007
Xantina	0.02 \pm 0.006 ^a	0.04 \pm 0.011 ^b	0.03 \pm 0.006	0.02 \pm 0.010	0.04 \pm 0.014 ^b	0.2 \pm 0.003 ^a
Ácido úrico	0.016 \pm 0.006 ^b	0.006 \pm 0.003 ^a	0.007 \pm 0.005 ^a	0.019 \pm 0.008 ^b	0.004 \pm 0.003	0.005 \pm 0.002
Inosina monofosfato (IMP)	0.025 \pm 0.012	0.022 \pm 0.009	0.021 \pm 0.007	0.019 \pm 0.006	0.035 \pm 0.010	0.025 \pm 0.012
Inosina	3.14E-03 \pm 1.43E-03	3.33E-03 \pm 2.16E-03	2.49E-03 \pm 1.83E-03	2.62E-03 \pm 7.97E-03	4.46E-03 \pm 2.29E-03	4.86E-03 \pm 2.58E-03
Nicotinamida difosfato	0.182 \pm 0.025	0.189 \pm 0.03	0.203 \pm 0.026	0.205 \pm 0.029	0.264 \pm 0.027	0.265 \pm 0.024
Guanosin difosfato (GDP)	0.025 \pm 0.004	0.020 \pm 0.005	0.030 \pm 0.007	0.029 \pm 0.008	0.026 \pm 0.005	0.023 \pm 0.004
Adenosin monofosfato (AMP)	2.11 \pm 0.41 ^b	1.11 \pm 0.36 ^a	2.06 \pm 0.56	1.67 \pm 0.52	1.48 \pm 0.43	1.21 \pm 0.33

Adenosin	9.55E-04 ± 3.52E-04	1.01E-03 ± 5.09E-04	5.46E-04 ± 2.45E-04 ^a	1.09E-03 ± 4.50E-04 ^b	6.37E-04 ± 3.02E-04 ^a	1.18E-03 ± 3.25E-04 ^b
Guanosin trifosfato (GTP)	0.045 ± 0.012	0.059 ± 0.010	0.053 ± 0.010	0.066 ± 0.017	0.065 ± 0.019	0.067 ± 0.016
Adenosin difosfato (ADP)	2.21 ± 0.4	1.82 ± 0.5	2.21 ± 0.4	2.39 ± 0.5	3 ± 0.4 ^b	2.48 ± 0.3 ^a
Adenosin trifosfato (ATP)	1.01 ± 0.4 ^a	2.76 ± 0.9 ^b	1.47 ± 0.4 ^a	2.49 ± 0.7 ^b	3.37 ± 0.8	3.47 ± 0.9

Valor promedio ± desviación estándar. D14= 14 días en alta densidad y 35 días con densidad óptima. Los superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada fase ($p < 0.05$).

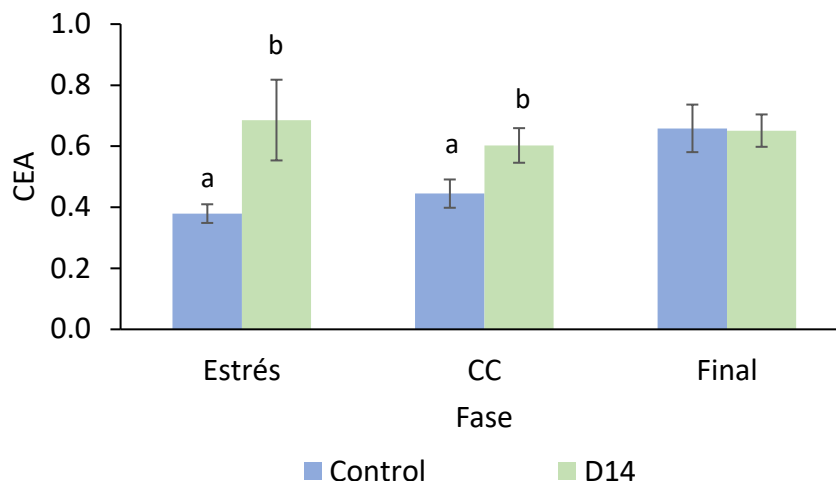


Figura 28. Carga energética adenínica observada en *P. vannamei* al día 14 de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días en alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada fase ($p < 0.05$).

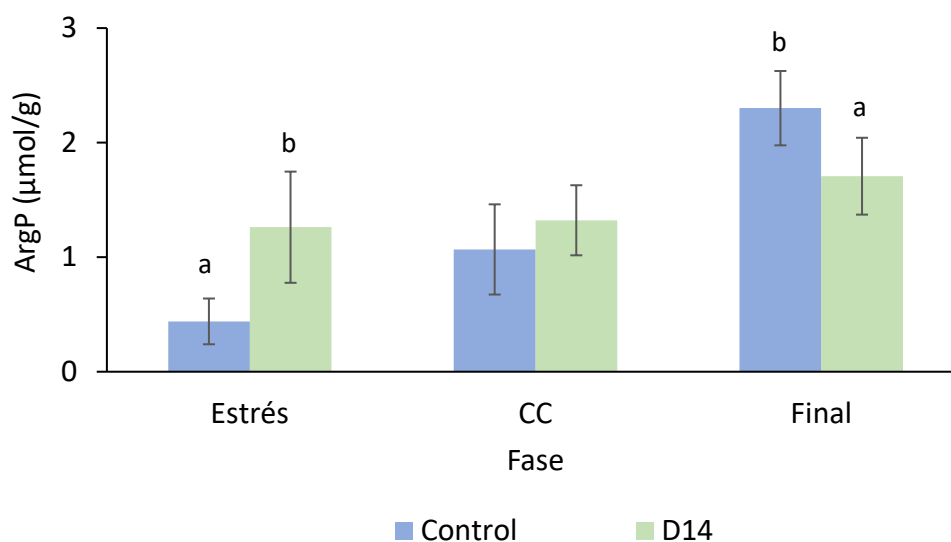


Figura 29. Concentración de arginin fosfato en *P. vannamei* al día 14 de estrés inducido por alta densidad de cultivo y a los días 7 (CC) y 35 (final) del periodo de recuperación con densidad óptima. D14= 14 días en alta densidad de cultivo, seguido de 35 días de recuperación con densidad óptima, CC= crecimiento compensatorio. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada fase ($p < 0.05$).

7.3.2.5 Metilación global del ADN

El porcentaje de metilación de ADN en los organismos expuestos a densidad alta por 14 días se redujo significativamente ($p < 0.05$) durante la fase de estrés. Esta tendencia se mantuvo al final de la etapa de recuperación con densidad de cultivo óptima (Fig. 30).

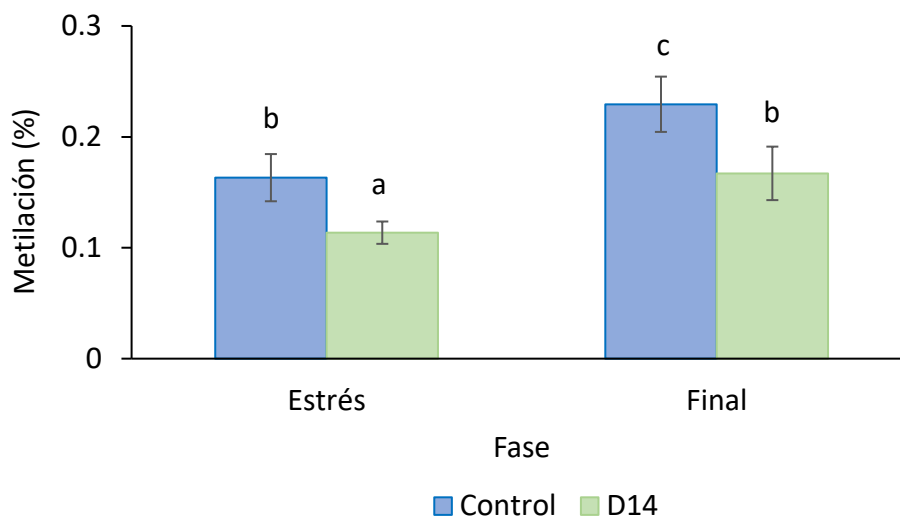


Figura 30. Porcentaje de metilación global del ADN en *Penaeus vannamei* durante la fase de estrés inducida por alta densidad de cultivo (1100 org/m^3) y durante la fase final de recuperación con densidad de cultivo óptima (220 org/m^3). Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos en cada fase ($p < 0.05$).

7.3.3 Expresión de genes en *P. vannamei* por efecto de la alta densidad de cultivo

7.3.3.1 Análisis bioinformático

Las secuencias genómicas presentaron un porcentaje de alineamiento superior al 85% con el genoma de referencia del camarón blanco *P. vannamei* (Tabla 23).

Tabla 23. Número de lecturas de las bibliotecas genómicas secuenciadas a partir muestras de hepatopáncreas del bioensayo (3) de densidad de cultivo y porcentaje de alineamiento al genoma de referencia de camarón blanco *Penaeus vannamei*.

Condición	Muestra	Número de lecturas	Alineamiento (%)
Tratamiento	D14a	26'636,808	85.30
	D14b	21'452,600	86.36
	D14c	21'595,948	85.37
Control	CD14a	23'054,453	85.83
	CD14b	24'405,183	85.42
	CD14c	22'839,922	85.69

Así mismo, a través del ensamble de transcritos se detectó un 20.7% de nuevos exones (Tabla 24).

Tabla 24. Estadísticas del ensamble de transcritos de las bibliotecas del bioensayo (3) de alta densidad de cultivo.

Exones faltantes:	0/151856	(0.0 %)
Nuevos exones:	44386/214538	(20.7 %)
Intrones faltantes:	0/126329	(0.0 %)
Nuevos intrones:	19565/156803	(12.5 %)
Loci faltantes:	0/25527	(0.0 %)
Nuevos loci:	15828/41092	(38.5 %)

7.3.3.2 Expresión diferencial de genes y categorías ontológicas

Bajo esta condición se encontraron 1138 genes expresados diferencialmente, de los cuales se determinó que 524 fueron sobre-expresados y 375 subexpresados con base en el valor fold change ($fc > 1$ = genes sobre-expresados; $fc < 1$ = genes subexpresados) (Tabla 25).

Tabla 25. Número de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei* expuesto a alta densidad de cultivo durante 14 días.

Número de genes:	Muestra D14
Genes expresados diferencialmente (ED)	1138
Genes únicos	1043
Genes anotados	899
Genes sobre-expresados	524
Genes subexpresados	375

De acuerdo con las categorías ontológicas, el 89.9% de los genes expresados diferencialmente se incluyó en la categoría de función molecular, el 90.5% está relacionado con los componentes celulares y el 88.5% se incluyó dentro de los procesos biológicos (Anexo D). La categoría de función molecular incluyó la sobre-expresión de genes relacionados con actividad catalítica (GO:0003824) y estructural (GO:0005198); mientras que en la categoría de procesos biológicos se sobre-expresaron genes relacionados con procesos metabólicos (GO:0008152) como la metilación, procesos de desarrollo (GO:0032502), localización (GO:0051179), procesos celulares (GO:0009987) y respuesta a estímulos (GO:0050896). Por otro lado, en la categoría de procesos biológicos se subexpresaron genes relacionados con la regulación de la actividad enzimática dentro de los procesos metabólicos (GO:0008152) y de respuesta antioxidante asociados con la respuesta a estímulos (GO:0050896), entre otros.

El análisis de enriquecimiento demostró que entre los términos ontológicos altamente significativos se encuentran los involucrados con actividades catalítica, protein quinasa, de unión al ARN y ATP, entre otros. Algunos de los términos enriquecidos menos representados se relacionan con la actividad superóxido dismutasa, actividad quinasa dependiente del cGMP, actividad fosfolipasa D, entre otros, mientras que los más representados están involucrados en proteólisis, transducción de señales intracelulares, beta-oxidación de ácidos grasos y componentes celulares. Se observó una mayor interacción entre los términos biológicos relacionados con proteólisis e iniciación de la translación, así como entre los relacionados con componentes celulares como la membrana del retículo endoplásmico, de Golgi y los endosomas (Fig. 31).



Figura 31. Términos enriquecidos durante el crecimiento compensatorio de *Penaeus vannamei* inducido por alta densidad de cultivo. El tamaño de la burbuja indica la frecuencia del término ontológico. El color representa la significancia del enriquecimiento; un color más claro indica un alto nivel de significancia. El grosor de las líneas indica el grado de similitud entre los términos ontológicos.

7.4 Genes asociados al crecimiento compensatorio inducido por distintos estresores

Al comparar los genes expresados diferencialmente (ED) durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei* inducido por distintos estresores (Fig. 32) se observaron 7 genes asociados con este mecanismo, es decir, genes involucrados en procesos biológicos o funciones moleculares que son alterados cuando el camarón se encuentra en crecimiento acelerado, no obstante, su nivel de expresión varía de acuerdo con el tipo de estresor (Tabla 26).

Los términos de los genes compartidos entre 2 condiciones distintas se muestran en el Anexo E.

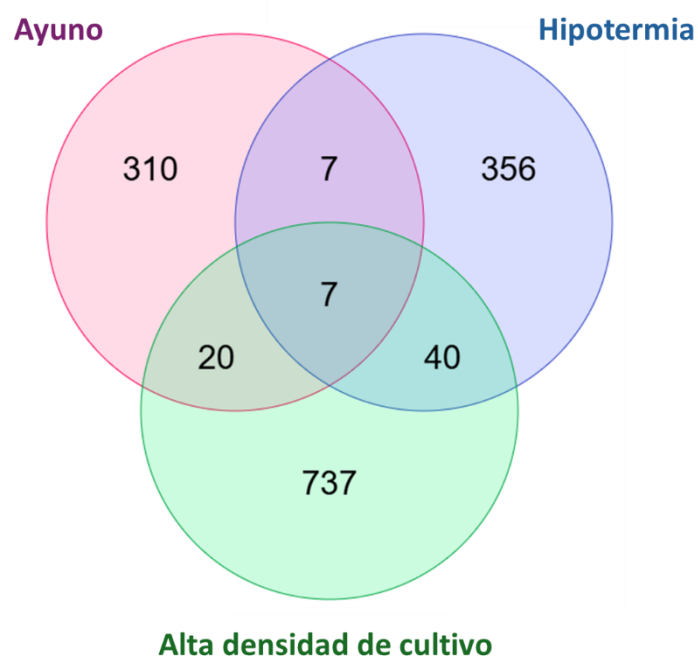


Figura 32. Diagrama de Venn que compara los genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei* inducido por ayuno, hipotermia y alta densidad de cultivo. En el centro se muestra el número de genes que coinciden entre las 3 condiciones y en las intersecciones los genes compartidos entre dos condiciones diferentes.

Tabla 26. Términos de genes expresados diferencialmente durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei* inducido por estresores temporales

Categoría	Identificador	Término	Gen (es)	Proteína	Nivel de expresión del gen inducido por estresores		
					Ayuno	Hipotermia	Alta densidad de cultivo
PB	GO:0006915	Apoptosis	<i>Mien1</i>	Proteína 1 potenciadora de la migración e invasión	SO	SU	SO
	GO:0032259	Metilación	<i>SMYD4</i>	Proteína 4 con dominio SET y MYND	SU	SU	SO
	GO:0008344	Locomoción	<i>Atpalpha</i>	ATPasa de sodio subunidad alfa	SU	SU	SO
	GO:0010496	Transporte intracelular	<i>Inx1</i>	Inexina	SU	SU	SU
	GO:0045087	Respuesta inmune innata	<i>MSRB1</i>	Metionina-R-sulfóxido reductasa B1	SO	SU	SU
	GO:0040003	Desarrollo de cutícula basado en quitina	<i>CG15920</i>	Resilina	SO	SU	SO
	GO:0043457	Regulación de la respiración celular	<i>TAR1</i>	Proteína TAR1	SU	SO	SO y SU
CC	GO:0005737	Citoplasma	<i>MSRB1</i> ; <i>SMYD4</i>	Metionina-R-sulfóxido reductasa; Proteína 4 con dominio SET y MYND	SO y SU	SU	SO y SU
	GO:0005739	Mitocondria	<i>TAR1</i>	Proteína TAR1	SU	SO	SO y SU
	GO:0009898	Membrana plasmática	<i>Mien1</i>	Proteína 1 potenciadora de la migración e invasión	SO	SU	SO

	GO:0016323	Membrana plasmática basolateral	<i>Atpalpha;</i> <i>Inx1</i>	ATPasa de sodio subunidad alfa; inexina	SU	SU	SO y SU
	GO:0062129	Matriz extracelular basada en quitina	<i>CG15920</i>	Resilina	SO	SU	SO
FM	GO:0070191	Actividad metionina-R-sulfóxido reductasa	<i>MSRB1</i>	Metionina-R-sulfóxido reductasa B1	SO	SU	SU
	GO:0005243	Canal de unión GAP	<i>Inx1</i>	Inexina	SU	SU	SU
	GO:0005524	Unión de ATP	<i>Atpalpha</i>	ATPasa de sodio subunidad alfa	SU	SU	SO
	GO:0008061	Unión de quitina	<i>CG15920</i>	Resilina	SO	SU	SO
	GO:0008168	Actividad metiltransferasa	<i>SMYD4</i>	Proteína 4 con dominio SET y MYND	SU	SU	SO

PB= procesos biológicos, CC= componente celular, FM= función molecular. SO = sobre-expresado, SU=subexpresado.

8. DISCUSIÓN

8.1 Respuesta de crecimiento compensatorio (CC) en *Penaeus vannamei* inducido por estresores temporales

8.1.1 Efecto del ayuno y temperatura

8.1.1.1 Crecimiento y supervivencia

En el medio natural los organismos acuáticos no siempre encuentran alimento disponible, por lo que están adaptados para resistir periodos de ayuno temporal (Steinberg, 2018). En organismos cultivados, como el camarón, se ha demostrado que estos periodos pueden inducir un crecimiento acelerado una vez que las condiciones óptimas son restablecidas, no obstante, la duración del ayuno también puede influir en esta respuesta.

Lin *et al.* (2012), reportaron que periodos de ayuno de 7, 14, 21 y 28 días reducen el peso de *Penaeus vanammei* de 3% a más del 10%. Estas observaciones concuerdan con lo observado en el presente estudio en donde los organismos sometidos a un periodo de ayuno prolongado de 7 y 14 días alcanzaron un peso significativamente menor que aquellos restringidos por menor tiempo (3 días). Al respecto Comoglio *et al.* (2004) reportaron que especies tropicales como *P. vannamei* difícilmente pueden tolerar la privación de alimento por más de 15 días, mientras que los camarones de zonas templadas pueden soportar la privación de alimento hasta por 4 semanas.

Zhang *et al.* (2010), evaluaron el crecimiento en *Fenneropenaeus chinensis* con periodos de 4, 8, 12 y 16 días de ayuno, y un tiempo de recuperación con alimentación a saciedad hasta el día 24; los autores reportaron que la tasa de crecimiento en el tratamiento sometido a 4 días de ayuno alcanzó un crecimiento compensatorio completo al no mostrar diferencias significativas respecto al crecimiento observado en el grupo control, mientras que el resto de los tratamientos alcanzó un crecimiento compensatorio parcial. En el presente estudio, el periodo más corto de ayuno a alta temperatura también permitió a los organismos compensar por completo su crecimiento. Las mismas observaciones fueron constatadas por Bezerra *et al.* (2019), quienes reportaron que dos

días de ayuno no tienen un efecto negativo sobre el crecimiento final de *P. vannamei*. En este sentido, se ha reportado que las especies son capaces de continuar creciendo durante más tiempo que aquellos organismos que no estuvieron restringidos (Lin *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados del presente estudio indican que un periodo de 14 días con privación de alimento influye negativamente en el crecimiento de esta especie ya que los organismos no fueron capaces de compensar su crecimiento al final del periodo experimental. Resultados similares fueron observados por Luo *et al.* (2021) en el cangrejo *Procambarus clarkii*.

En lo que respecta a la supervivencia, Comoglio *et al.* (2004) reportaron que *P. vannamei* fue capaz de sobrevivir 16 días sin alimento y después de 9 días de alimentación a saciedad, observaron una supervivencia del 65%. Por su parte Lin *et al.* (2012) evaluaron el efecto de 7, 14, 21 y 28 días de ayuno sobre el porcentaje de supervivencia de *P. vannamei* reportando un 100, 90, 71 y 59%, respectivamente. En el presente estudio la supervivencia no fue afectada por los periodos de ayuno a temperaturas de 22°C y 26°C, sin embargo, a 30°C la supervivencia disminuyó conforme se incrementó el periodo de ayuno. Estos resultados indican que una temperatura por debajo de la óptima podría preservar la tolerancia a la falta de alimento en esta especie y que el camarón es capaz de adaptarse a periodos con poca o nula disponibilidad de alimento (Steinberg, 2018).

8.1.1.2 Expresión de genes inducida por ayuno

Durante el crecimiento compensatorio (CC) de los camarones expuestos previamente a 3 días de ayuno (A3) se sobre-expresaron genes que codifican para las enzimas acetato quinasa y piruvato deshidrogenasa E1 (PDHE1-A) implicadas en la biosíntesis de acetil-CoA (GO:0006085), sugiriendo un aumento del proceso glucolítico para la producción de ATP durante el crecimiento acelerado. Sin embargo, la acetil-CoA también es un precursor importante para la biosíntesis de lípidos (Wynn *et al.*, 2001). Bajo un exceso de glucosa, el citrato es transportado al citosol para regenerar acetil-CoA y oxaloacetato para la síntesis de ácidos grasos y esteroides (Srere, 1959). En el presente estudio, esto está respaldado por la sobreexpresión del transportador de citrato (GO:0098656), que proporciona una correlación directa entre el metabolismo de los carbohidratos y la

biosíntesis de lípidos (Yang *et al.*, 2021), lo que indica una etapa con alta disponibilidad de combustibles energéticos (Shi y Tu, 2015) y almacenamiento de lípidos durante el crecimiento compensatorio. Por otra parte, la sobre-expresión de genes codificantes para la enzima amilo-1,6-glucosidasa involucrada en el catabolismo del glucógeno (GO:0005980), sugiere que los organismos en CC utilizan energía almacenada, como el glucógeno, para satisfacer sus necesidades energéticas después de un corto período de estrés, tal como se ha reportado en camarones en respuesta a cambios ambientales como la salinidad, hipoxia e inanición (Oliveira *et al.*, 2001).

No obstante, el glucógeno también es un precursor de la síntesis de quitina (Rosas *et al.*, 1995; Cuzon *et al.*, 2000), el principal componente del caparazón de los camarones. Por lo tanto, la sobre-expresión de genes incluidos en el término ontológico del proceso de desarrollo, como los genes que codifican la proteína gustavus involucrada en la formación del patrón de cutícula (GO:0035017) y la pro-resilina involucrada en el desarrollo de la cutícula a base de quitina (GO:0040003), sugieren su participación en el proceso de muda que es esencial para su crecimiento. Esto es consistente con la sobre-expresión de genes que codifican las miosinas de cadena pesada 1, 2 y 6a, principales componentes del músculo contráctil (Zhang *et al.*, 2019), así como los que codifican actina 1, actina 2 e integrina beta-PS implicados en la organización del filamento de actina (GO:0007015). Tanto las miosinas como las actinas están implicadas en el crecimiento muscular y el desarrollo de los organismos (Venkatesh *et al.*, 1996), tal como se ha observado después de condiciones de inanición en la carpa herbívora (He *et al.*, 2015). En conjunto, la sobre-expresión de estos genes soporta el crecimiento óptimo de los camarones al final del período experimental.

La sobre-expresión de genes que codifican la amida hidrolasa 2-B de ácidos grasos, implicada en el catabolismo de los lípidos (GO:0016042), la epimerasa del ácido siálico implicada en el metabolismo de los hidratos de carbono (GO:0005975), la dipeptidasa no específica citosólica y la dipeptidasa A implicadas en la proteólisis (GO:0006508), sugiere que los camarones previamente estresados por la condición de ayuno de corta duración (A3) utilizan vías metabólicas

alternativas para obtener energía de los nutrientes suministrados a través de la dieta durante la etapa de recuperación.

Por otro lado, los genes incluidos en el término ontológico relacionado con la respuesta a estímulos, se subexpresaron durante el CC, como la proteína codificada por el gen p53 implicada en la respuesta celular al estímulo de daño en el ADN (GO:0006974). En estudios previos se ha reportado una correlación entre la expresión del gen p53 y los genes relacionados con la actividad antioxidante. Por ejemplo, la expresión de p53 inducida por pH de 5.3 en la tilapia *Oreochromis niloticus* aumentó la expresión de las enzimas antioxidantes MnSOD y GPx (Mai *et al.*, 2010). Por el contrario, el silenciamiento de p53 inducido por inyección de ARN de doble cadena en camarones *P. vannamei* (Lvp53), también redujo los niveles de expresión de las enzimas antioxidantes MnSOD y GPx (Qian *et al.*, 2014), lo que es consistente con los resultados del presente estudio, donde el ayuno de 3 días indujo la subexpresión simultánea de p53 y superóxido dismutasa 1 (GO:0019430). Sin embargo, la tasa de supervivencia final del tratamiento A3 en este estudio fue similar a la del grupo control, lo que sugiere que, a pesar de la subexpresión de esta enzima antioxidante, se evitó eficazmente un posible estrés oxidativo durante el crecimiento compensatorio.

En contraste, durante el punto de no retorno del camarón (PNR), se sobre-expresaron genes que codifican el péptido metionina sulfóxido reductasa (GO:0034599; MsrA) y fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (GO:0006979; PHGPx) implicados en la respuesta al estrés oxidativo. La MsrA es una importante enzima antioxidante para reparar proteínas dañadas por la oxidación de la metionina (Levine *et al.*, 2000) que desnaturaliza las proteínas dando lugar a alteraciones estructurales (Stadtman *et al.*, 2003). Mientras que la PHGPx es la única enzima antioxidante capaz de reducir los peróxidos lipídicos unidos a las membranas celulares (Ursini *et al.*, 1995). La sobre-expresión de MsrA y PHGPx indica la capacidad de respuesta del sistema antioxidante del camarón para hacer frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS), sin embargo, también sugiere daño en proteínas y células en respuesta al período prolongado de ayuno, respaldado por la mortalidad observada en el tratamiento expuesto a 14 días de ayuno (A14).

Durante esta condición, también se sobre-expresaron genes que codifican la proteína SmydA-8 involucrada en la metilación de histonas (GO:0034968), implicada en la activación o supresión de la transcripción (Zhang y Reinberg, 2001). En larvas de *Solea senegalensis*, la baja temperatura (15°C) induce mayores niveles de metilación del promotor del *myog*, respecto a lo observado a 18 y 21°C, y se correlaciona con la disminución en la expresión de *myog* y el crecimiento muscular (Campos *et al.*, 2013). Por lo tanto, la sobre-expresión de estos genes en el presente estudio pone de manifiesto la importancia de una futura evaluación epigenética durante los cambios ambientales para conocer las regulaciones transcriptómicas asociadas a la metilación del ADN.

Por otro lado, los camarones asociados con el PNR subexpresaron genes codificantes para la enzima fosforilasa b-quinasa involucrada en el metabolismo del glucógeno (GO:0005977), la proteína pro-resilina relacionada con el desarrollo de la cutícula a base de quitina (GO: 0040003) y las proteínas de cutícula (CP1158, AMP4, AM1159, AM1239 y PCP27) implicadas en la constitución estructural de las cutículas (GO:0042302). Esto sugiere que 14 días de ayuno afectaron la homeostasis energética y el proceso de muda durante la etapa de recuperación de los camarones, enfatizando la reducida capacidad de crecimiento observada, incluso cuando se restablecieron las condiciones favorables.

Además, el período prolongado de ayuno continuo también resultó en la subexpresión de los genes que codifican las subunidades reguladoras del proteasoma 26S implicada en el catabolismo proteico dependiente de ubiquitina (GO:0043161), la aminoacilasa 1A implicada en el catabolismo proteico (GO:0030163) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa implicada en el metabolismo de la glucosa (GO:0006006), indicando que los metabolismos de las proteínas y la glucosa se vieron afectados principalmente por el ayuno prolongado. Esta condición también indujo la subexpresión de la enzima NAD quinasa involucrada en el metabolismo de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD; GO:0019674), que actúa como cofactor en múltiples reacciones redox relacionadas con la producción de energía, la glucólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, la oxidación de ácidos grasos, la fosforilación oxidativa y la biosíntesis de serina (Poljsak, 2016; Yaku *et al.*, 2018), sugiriendo afectación de los procesos metabólicos por el

período prolongado de ayuno. La subexpresión de estos genes se asoció con la incapacidad de *P. vannamei* para compensar el crecimiento después de un período de ayuno prolongado.

8.1.2 Efecto del estrés térmico

8.1.2.1 Crecimiento y supervivencia

La temperatura es uno de los factores más importantes que controlan el crecimiento del camarón, además de tener un efecto sobre el metabolismo en todos los estadios de su ciclo de vida (Ponce-Palafox *et al.* 1997; Zhang *et al.*, 1998; Velázquez *et al.*, 2012).

En el presente estudio, los organismos sometidos a alta temperatura (32°C) durante 14 días presentaron mayor peso respecto al resto de los tratamientos (22 y 28°C), debido a que la temperatura óptima para el crecimiento acelerado de *Penaeus vannamei* con tallas por debajo de 5 g puede ser superior a 30°C (Wyban *et al.*, 1995) y hasta 32°C (Jiang *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2007; Ponce-Palafox *et al.*, 2019). Por lo tanto, las altas temperaturas aceleran el crecimiento del camarón y con ello se acorta el periodo de cultivo.

Los organismos mantenidos a 22°C presentaron una reducción en su crecimiento y actividad. Esto se debe a que el camarón es poiquiloterma, por lo que las temperaturas bajas disminuyen su metabolismo y aumentan sus necesidades energéticas para enfrentar el estrés, lo cual conlleva a una disminución de las reservas utilizadas para el crecimiento (Ren *et al.*, 2021). Lo anterior explica su permanencia mayormente en el fondo del acuario y un menor consumo de alimento que los camarones expuestos a 32°C y el control. Este comportamiento se ha observado en camarones de la misma especie expuestos a 20°C que se mantuvieron relativamente inactivos y exhibieron menor consumo de alimento comparado con los organismos hiperactivos a 35°C (Ponce-Palafox *et al.*, 1997). En este estudio, incluso el consumo de alimento fue mayor en los organismos mantenidos a 32°C que los del grupo control, manteniéndose constante a lo largo del periodo experimental. En consecuencia, el consumo de alimento en este grupo fue superior al 12% respecto al grupo sin estrés.

Una vez que la temperatura fue restablecida en los tratamientos de temperatura baja, se observó mayor consumo de alimento asociado a un crecimiento acelerado, que les permitió compensar parcialmente su crecimiento. No obstante, a nivel global el periodo a baja temperatura permitió un ahorro de alimento hasta del 29%, ligeramente superior al 27.4% reportado con ciclos de ayuno/realimentación durante 9 semanas en la misma especie (Castro y Ordinola-Zapata, 2021). Entre los días 21 y 49 la tasa de crecimiento en los tratamientos sometidos previamente a baja temperatura durante 14 días fue significativamente mayor respecto al resto de los tratamientos, en concordancia con lo observado en otros estudios donde el crecimiento compensatorio ocurre entre los 10 y 30 días después del restablecimiento de las condiciones de cultivo adecuadas (Wu *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2003; Wasielesky *et al.*, 2013).

La temperatura elevada puede ser adecuada para el crecimiento de organismos acuáticos, sin embargo, puede tener un efecto inverso en la supervivencia. En *Penaeus semisulcatus* el porcentaje de supervivencia es mayor a bajas temperaturas (22°C y 26°C) respecto a temperaturas altas (30°C y 34°C) (Kumlu *et al.*, 2000). Por el contrario, en el presente estudio se observó una tendencia no significativa de menor supervivencia a baja temperatura respecto al grupo control y los tratamientos de alta temperatura. Estas observaciones sugieren que el efecto de la temperatura en la supervivencia puede estar asociado a la tolerancia térmica de las especies. Por ejemplo, para *F. chinensis* la temperatura óptima para su crecimiento y supervivencia es de 26°C, en comparación con una temperatura óptima de 28°C recomendada para *P. vannamei* (Martínez-Córdova, 1999).

Puesto que el estrés térmico temporal permite una recuperación parcial del crecimiento sin influir significativamente en la supervivencia, esta estrategia podría ser empleada en regiones donde la producción de camarón está limitada por las bajas temperaturas (Prates *et al.*, 2020).

8.1.2.2 Respuesta fisiológica asociada al estrés térmico

A nivel fisiológico, se observó que el estrés térmico induce diferentes respuestas en *P. vannamei*. En lo que respecta al sistema antioxidante, la actividad de las enzimas se normalizó en menos

tiempo en los camarones expuestos a estrés térmico de 7 días comparado con camarones expuestos a un periodo prolongado de estrés. En este sentido, la hipertermia prolongada disminuyó la actividad SOD durante la fase de recuperación a 28°C, tal como se observó en *P. monodon* durante la etapa de recuperación después de haber sido expuesto a estrés agudo a 15°C (Jiang *et al.*, 2019) y en *P. vannamei* expuesto a 20°C y 24°C (Cheng *et al.*, 2005). Mientras que el periodo prolongado de estrés a 32°C indujo mayor actividad CAT y GPx, sugiriendo mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como consecuencia de la aceleración del metabolismo. De igual forma Estrada-Cárdenas *et al.* (2021) reportaron un incremento en la actividad CAT en *P. vannamei* por efecto de hipertermia a 35°C, señalando una alta concentración de H₂O₂, puesto que la enzima presenta menor afinidad por este sustrato en comparación con otras peroxidasas.

Por otro lado, para compensar los requerimientos energéticos durante la etapa de recuperación a 28°C, el camarón indujo la movilización de reservas energéticas y el uso de sustratos metabólicos. Después de 7 días de hipotermia, se observó una disminución en el nivel de glucosa en el hepatopáncreas así como un incremento de la actividad lipasa y en consecuencia, se observó un mayor contenido de lípidos presentes en el hepatopáncreas, sugiriendo que estos compuestos son usados preferiblemente sobre otros sustratos ya que aportan mayor cantidad de energía (Racotta y Hernández-Herrera, 2000) para cubrir los requerimientos asociados al crecimiento acelerado y el proceso de muda (Sánchez-Paz *et al.*, 2006). Los niveles de proteínas en hepatopáncreas, glucógeno en músculo y hepatopáncreas, así como el incremento de triglicéridos en hemolinfa después de la hipotermia prolongada, sugieren la resíntesis de reservas energéticas, así como la preparación del camarón para protegerse de nuevos episodios de estrés térmico. Sin embargo, la poca movilización de reservas energéticas observada durante la recuperación después de la hipotermia prolongada podría ser causado por un desorden metabólico generado por el periodo de exposición a baja temperatura, ya que los crustáceos carecen de reguladores eficientes haciéndolos sensibles a temperaturas bajas (Anestis *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2021). Por otra parte, la alta actividad quimotripsina inducida por el periodo de hipotermia prolongado, indica la preferencia de *P. vannamei* sobre sustrato proteico en la etapa de recuperación a 28°C, tal como lo observado en el camarón *F. chinensis* después de ciclos de

restricción alimenticia (Zhang *et al.*, 2010) o en *P. vannamei* expuesto a distintos regímenes alimenticios en un sistema biofloc (Peixoto *et al.*, 2017).

El estrés inducido por alta temperatura modifica de igual manera la actividad de las enzimas digestivas y la movilización de reservas energéticas durante el periodo de recuperación; sin embargo, este efecto es más pronunciado por la hipertermia prolongada. La disminución en el contenido de glucógeno en músculo y hepatopáncreas, junto con el de lípidos en hepatopáncreas por efecto de esta condición, es comparable con la respuesta a estrés agudo por inanición en la misma especie (Sánchez-Paz *et al.*, 2007). El catabolismo de lípidos es una importante fuente de energía para mantener la homeostasis en camarón (Wang *et al.*, 2021), mientras que el glucógeno no sólo es una fuente de energía sino también precursor para la síntesis de quitina, relacionada con el ciclo de muda (Cuzon *et al.*, 2000; Sánchez-Paz *et al.*, 2007). A diferencia del estrés térmico agudo, la hipertermia prolongada reduce la preferencia sobre los sustratos lipídicos y mantiene el uso preferente de proteínas disponibles en la dieta como fuente de energía durante la etapa de recuperación a 28°C.

8.1.2.3 Expresión de genes inducida por hipotermia prolongada

La capacidad de respuesta a nivel fisiológico y productivo que presentó *P. vannamei* por efecto de la hipotermia prolongada tuvo correlación con la expresión y represión de algunos genes. En este sentido la sobre-expresión de genes codificantes para actinas y miosinas soportan el crecimiento acelerado del camarón observado durante la fase de recuperación, ya que ambas proteínas constituyen los principales componentes del músculo (Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, la represión de genes asociados con las pro-resilinas involucradas en el desarrollo de la cutícula (GO:0040003) y el factor de crecimiento PDGF (GO:0008083), podrían estar asociadas al crecimiento parcial observado bajo esta condición, ya que este último juega un papel primordial en el crecimiento y desarrollo al estimular la proliferación celular, entre otros (De *et al.*, 2013).

Aunado a lo anterior, la capacidad limitada de crecimiento del camarón podría explicarse por la represión de diversos genes codificantes para proteínas o enzimas involucradas en la obtención

de energía, como la hexoquinasa que participa en el proceso glucolítico (GO:0006096), la acil-CoA deshidrogenasa que participa en la oxidación de ácidos grasos (GO:0006635), la proteína de ensamble del citocromo c oxidasa (GO:0033617) y la quinasa nicotinamida ribosa encargada de sintetizar NAD⁺, que juega un papel primordial en diversas reacciones del metabolismo energético (Navas y Carnero, 2021). Adicionalmente, los genes de la proteína fosfatasa 1 subunidad 3C (PPP1R3C) que inhibe la descomposición de glucógeno (Q6P950) y de la proteína 1 relacionada con la lipasa (PNLIPRP1) que inhibe la digestión de triglicéridos (P54315), fueron sobre-expresados impidiendo usar estos compuestos de reserva para cubrir los requerimientos energéticos del camarón durante el crecimiento acelerado. Esto es consistente con el contenido de glucógeno y triglicéridos observado en los tejidos después de la hipotermia prolongada.

Durante el crecimiento compensatorio también se sobre-expresaron genes que codifican la proteasa Lon, una enzima que participa en la degradación de proteínas anormales y mutantes, actuando como chaperona de proteínas mal plegadas (Pinti *et al.*, 2016). Se ha observado que las proteasas Lon se sobre-expresan después del estrés térmico, sugiriendo su relevancia en la respuesta al shock térmico (Dyck *et al.*, 1994). En este sentido, la sobre-expresión de estos genes se asocia con el incremento de la temperatura en la fase de recuperación de 22°C a 28°C. Sin embargo, genes que codifican proteínas de shock térmico (HSP90) fueron subexpresados, señalando una respuesta parcial a la tolerancia térmica del camarón durante este periodo.

En lo que respecta al sistema antioxidante se observó la sobre-expresión de genes que codifican la enzima glutatión S transferasa T1 (GSTT1) que cataliza la desintoxicación de oxígeno reactivo y los productos de peroxidación lipídica (Pinhel *et al.*, 2008), por lo que su actividad se relaciona con una mayor exposición al estrés oxidativo (Uzunoglu *et al.*, 2006). En el presente estudio, este gen se relacionó con el incremento en la actividad GPx observada durante el crecimiento compensatorio del camarón, ya que en el metabolismo del glutatión esta enzima utiliza el glutatión reducido para la reducción del peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos (Ramírez *et al.*, 2007). Simultáneamente, genes relacionados con la actividad glutatión peroxidasa (GO:0004602) fueron reprimidos, lo que podría sugerir el principio del estado de homeostasis de la actividad antioxidante.

La expresión de genes relacionada con la respuesta inmune en el camarón proporciona información importante sobre la activación y modulación del sistema inmune (Wang *et al.*, 2007). En este estudio, la sobre-expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata (GO:0002218), sugiere que el crecimiento compensatorio de *P. vannamei* inducido por la hipotermia prolongada no afecta negativamente la defensa innata del camarón, sin embargo, estos resultados deben ser corroborados con otros parámetros de inmunidad.

8.1.3 Efecto de la alta densidad de cultivo

8.1.3.1 Crecimiento y supervivencia

Uno de los retos más importantes en la camaronicultura es incrementar la producción a través de su cultivo en altas densidades (Rubio-Gastelum *et al.*, 2014). Estos sistemas permiten reducir los costos de operación, disminuyen la susceptibilidad de los organismos a nuevas condiciones de cultivo y aumentan el número de cosechas (Wasielesky *et al.*, 2013; Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2015) por lo que establecer el mejor régimen de manejo en alta densidad es crítico para la viabilidad económica de la producción.

Así mismo el uso de cultivos con alta densidad funge como una estrategia para inducir crecimiento compensatorio cuando los organismos son transferidos a densidades más bajas (Wasielesky *et al.*, 2013). Algunos estudios realizados en cultivos comerciales de *P. vannamei* han demostrado que el camarón presenta CC parcial cuando es transferido de una mayor a menor densidad de cultivo (Valverde-Moya y Alfaro-Montoya, 2015) y que es capaz de tolerar periodos prolongados en alta densidad (Fóes *et al.*, 2016). En el presente estudio, el camarón expuesto a 14 días de alta densidad presentó crecimiento compensatorio completo al ser transferido a densidades más bajas, mientras que los organismos que permanecieron por 21 días en esta condición alcanzaron un CC parcial respecto al grupo no estresado, lo cual podría sugerir alteraciones negativas en la capacidad del camarón para la obtención y asimilación de nutrientes suministrados a través de la dieta, dada la tendencia a consumir menos alimento y el incremento en el factor de conversión alimenticia observados, o bien, la necesidad de mayor tiempo de recuperación.

Se ha señalado que el hacinamiento asociado a la alta densidad puede generar canibalismo y lesiones en los organismos afectando la supervivencia y crecimiento del camarón (Yuan *et al.*, 2018). En el presente estudio la supervivencia no se vio afectada aún en el periodo más largo de estrés, inclusive, el porcentaje registrado fue superior a lo reportado en *P. monodon* (Nga *et al.*, 2005) y *P. stylirostris* (Martin *et al.*, 1998) expuestos a distintas densidades de cultivo. Un porcentaje de supervivencia similar fue observado en *P. indicus* cultivado experimentalmente en altas densidades (Anand *et al.*, 2021), y supervivencias mayores han sido reportadas en *P. vannamei* al ser expuesto a altas densidades y alimentado simultáneamente con dietas suplementadas con ácido araquidónico (Aguilar *et al.*, 2012). Esto sugiere que la respuesta de crecimiento y supervivencia por efecto de la densidad en esta especie podría estar asociada con otros factores, como el tipo de alimento (Wasielesky *et al.*, 2013).

8.1.3.2 Respuesta fisiológica de *P. vannamei* durante y después del estrés asociado a la alta densidad de cultivo

El estrés activa un conjunto de reacciones asociadas con distintas rutas metabólicas (Sokolova y Lanning, 2008) como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, que resultan en la necesidad de un mayor consumo de energía para satisfacer las demandas energéticas adicionales (Wang *et al.*, 2021). El fosfato de arginina (ArgP por sus siglas en inglés) y el ATP son fuentes de energía inmediata que aprovechan los crustáceos durante una situación de estrés (Abe *et al.*, 2007, Robles-Romo *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente estudio la concentración de ambos compuestos fue mayor durante el estrés por alta densidad respecto al grupo control, lo cual a su vez aumentó el nivel de carga energética adenílica (CEA) del camarón bajo esta condición. Resultados similares fueron observados por Apún-Molina *et al.* (2017) en *P. vannamei* al retarlo con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) por 14 h después de su cultivo en alta densidad. Los autores mencionan que el incremento de ambos compuestos podría estar relacionado con un estado de depresión metabólica (Thibodeaux *et al.*, 2009) en el cual se produce más energía de la que se gasta. Por otra parte, los resultados de este estudio indican un menor contenido de lactato en la hemolinfa de *P. vannamei* durante la fase de estrés por alta densidad, sugiriendo una posible inhibición del metabolismo anaerobio, tal como lo señalaron

Racotta y Hernández-Herrera (2000) al exponer al camarón a estrés agudo por concentraciones de amonio. Aunque se ha señalado que las altas concentraciones de ATP y ArgP están asociadas con las fibras musculares que producen energía predominantemente a través del metabolismo anaerobio (England y Baldwin, 1983; Speed *et al.*, 2001), la reducción de éste y la estabilidad de la CEA durante el estrés son características de depresión metabólica (Guppy *et al.*, 1994; Reipschlager y Pörtner, 1996), lo cual sustenta los resultados observados.

En el presente estudio el contenido de triglicéridos y proteínas disminuyó en el camarón durante el periodo de estrés, sugiriendo la activación de mecanismos de compensación de energía para hacer frente al estrés. Sánchez-Paz *et al.*, (2007) también observaron una reducción de proteínas en hemolinfa de *P. vannamei* durante el estrés por ayuno y señalaron que las proteínas son las primeras reservas que disminuyen durante periodos de estrés posiblemente como una estrategia adaptativa para reducir el uso de macromoléculas que requieren de un alto costo energético. En este sentido, la síntesis proteica puede requerir aproximadamente el 37% del metabolismo aeróbico de los crustáceos (Houlihan *et al.*, 1990). No obstante, el incremento en la actividad de las enzimas proteolíticas durante la fase de estrés sugiere un mayor requerimiento proteico para el mantenimiento de la homeostasis durante la densidad alta, tal como se ha observado durante la exposición del camarón a baja salinidad, ya que a través de éstas también puede producirse glucosa mediante la ruta gluconeogénica (Rosas *et al.*, 2001). Por otro lado, la reducción de lípidos se ha asociado con periodos de estrés por exposición al amonio (Miranda-Filho *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2019), aumento de temperatura (Pascual *et al.*, 2003) y ayuno (Sánchez-Paz *et al.*, 2007), resaltando su papel en el mantenimiento de la homeostasis energética durante proceso de adaptación a entornos estresantes (Wang *et al.*, 2021).

Por otra parte, cuando se activa la capacidad de crecimiento compensatorio, hay una fase de catabolismo activo en el que las reservas energéticas tienden a agotarse, modulando los estimulantes e inhibidores del apetito, y el flujo de energía proveniente de la dieta se asimila con mayor eficiencia (Won y Borski, 2013; Dar *et al.*, 2018). Lo anterior respalda las observaciones del presente estudio respecto al incremento de la actividad lipasa y quimotripsina durante la recuperación del camarón en densidad óptima, así como el menor contenido de glucógeno y

proteína en el hepatopáncreas. Por un lado, el glucógeno además de ser una fuente de aporte energético a través del metabolismo anaerobio (Sánchez-Paz *et al.*, 2007) es importante en el proceso de muda como precursor para la síntesis de quitina (Zhang *et al.*, 2021); mientras que las proteínas por su parte juegan un papel tanto en el crecimiento como en los ajustes fisiológicos para el mantenimiento de la homeostasis (Rosas *et al.*, 2001), de modo que el uso de ambos sustratos durante la etapa de recuperación sustentan el crecimiento acelerado del camarón. Aunado a esto, el menor contenido de colesterol observado en el hepatopáncreas durante esta etapa (CC), sugiere su requerimiento como componente estructural de las membranas celulares indispensables en un proceso de división o crecimiento celular (Racotta y Hernández-Herrera, 2000), o como precursor para la síntesis de la hormona de la muda (Kang y Spaziani, 1995).

El aumento de la tasa metabólica por estrés también genera una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (He *et al.*, 2017), como ha sido observado en *P. vannamei* por exposición a concentraciones de amonio (Liu y Chen, 2004) y en *P. monodon* expuesto a 35°C (Jiang *et al.*, 2019). Los resultados del presente estudio demuestran que la alta densidad de cultivo también induce la producción de especies reactivas de oxígeno en *P. vannamei*, medidas a través de los niveles de hipoxantina y xantina detectados en el músculo del camarón durante el periodo de estrés, ya que la oxidación de la hipoxantina genera aniones superóxido además de xantina y ácido úrico (León *et al.*, 2018; Carvajal, 2019). Sin embargo, también se observó mayor actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) durante esta fase, indicando un mecanismo de defensa antioxidante activo. En cambio, durante el crecimiento compensatorio del camarón, los niveles de hipoxantina y xantina se normalizaron, y la actividad CAT se redujo significativamente, contrario a lo que se ha observado en el camarón durante el CC inducido por restricción alimenticia (Py *et al.*, 2024). Tal disminución en la actividad antioxidante podría sugerir un mecanismo de homeostasis frente a las nuevas condiciones experimentales en el que la energía es dirigida principalmente hacia el crecimiento (Py *et al.*, 2024).

Por otro lado, la metilación del ADN es una importante modificación epigenética que está estrechamente relacionada con factores ambientales (Zhu *et al.*, 2023), incluyendo condiciones de estrés (Navarro-Martín *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2016; Metzger y Schulte, 2017). Este mecanismo

tiene implicaciones significativas en la regulación de la expresión genética, regulación de la transcripción y otros procesos celulares (Bird, 2002; Goll y Bestor, 2005; Cedar y Bergman, 2012). Los resultados del presente estudio demuestran que el incremento en la densidad genera cambios epigenéticos en *P. vannamei* reduciendo el porcentaje de metilación global de ADN durante el periodo de estrés y el de recuperación. Resultados similares fueron observados en el escarabajo *Diploptera punctata* a 28°C comparado con otras temperaturas (de la Peña *et al.*, 2021) y contrastan con el incremento de ADN metilado observado en el ostión *Crassostrea gigas*, donde este mecanismo juega un papel preponderante en la determinación del sexo (Sun *et al.*, 2022). En un estudio reciente con *P. vannamei*, se observó que durante el estrés hipotérmico algunos genes relacionados con la termogénesis, glucólisis, vía de la autofagia, peroxisoma y el metabolismo de fármacos, se hipermetilan y desmetilan generando cambios en la expresión génica (Zhu *et al.*, 2023). Los autores sugieren que la metilación de estos genes participa en la tolerancia térmica de la especie. Considerando lo anterior, se requiere una investigación epigenética más profunda para evaluar la metilación de genes relacionados con rutas o procesos específicos asociados al crecimiento compensatorio inducido por la alta densidad.

8.1.3.3 Expresión de genes durante el crecimiento compensatorio inducido por 14 días de alta densidad de cultivo

El análisis de expresión génica inducido por la densidad de cultivo de *P. vannamei*, también mostró correlación con la respuesta fisiológica del camarón durante el periodo de recuperación. Por un lado, se sobre-expresaron genes que favorecieron el crecimiento del camarón después del estrés por alta densidad, como los que codifican para la actina 57B implicada en el desarrollo y contracción muscular (Venkatesh *et al.*, 1996), la distrofina que ayuda a mantener la estructura de las células musculares (Blake *et al.*, 2002), la proteína AMP4 y la pro-resilina, implicadas en la composición (GO:0042302) y desarrollo de la cutícula (GO:0040003), respectivamente. Además de genes codificantes de las proteínas quinasa con dominio proteico y la dependiente de cGMP, relacionadas con la fosforilación de proteínas (GO:0006468) que es el mecanismo principal para regular la organización del citoesqueleto y la diferenciación celular (González, 2000), así como genes que codifican los factores de transcripción E2F2 y C2H2, esenciales para la progresión del ciclo celular (Delgado *et al.*, 2011).

Por otro lado, se incrementó la expresión de diversos genes relacionados con el proceso glucolítico y la producción de energía, como la NADH ubiquinona oxidorreductasa y la ATP sintasa encargada de sintetizar ATP a partir de ADP (Neupane *et al.*, 2019). Además de la enzima NAD sintasa involucrada en la síntesis de novo del NAD, un importante cofactor dentro del metabolismo energético (Navas y Carnero, 2021) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). La enzima AMPK actúa preservando el ATP al incrementar la generación de éste a través de diversas rutas y disminuyendo las que lo consumen, como la síntesis de proteínas (Winder y Hardie, 1999; Kemp *et al.*, 2002). Esto podría explicar el mayor contenido de ATP y CEA durante el periodo de CC relacionado con un menor contenido de proteínas en el hepatopáncreas, así como la activación del proceso glucolítico asociado con la sobreexpresión de genes codificantes de la enzima hexoquinasa (GO:0006096) y de los transportadores de hexosas con baja afinidad (HXT11) capaces de transportar gran variedad de sustratos, entre ellos la glucosa (GO:0008645) y que se expresan cuando el sustrato es muy abundante (Bosdriesz, 2015). Además, se relaciona con el mayor uso de glucógeno durante el crecimiento acelerado y la beta-oxidación de ácidos grasos (GO:0006635) asociada con la sobre-expresión de genes que codifican la acil-CoA oxidasa. Aunque no fue posible determinar la expresión de genes durante el periodo de estrés, la activación de la enzima AMPK se ha asociado con el ejercicio prolongado y el estrés por hipoxia (Winder y Hardie, 1999; Kemp *et al.*, 2002), por lo que podría estar relacionada con el mayor contenido de ATP y carga energética (CEA) en el camarón durante el periodo de alta densidad.

Durante el periodo de estrés se incrementó la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y tripsina, mientras que durante el CC del camarón su actividad fue regulada y no se observaron cambios significativos respecto al grupo control, lo cual se asocia con la menor expresión de los genes que codifican ambas enzimas y podrían sugerir el mecanismo para mantener la homeostasis celular. Tal como la subexpresión de los genes codificantes de las enzimas acil-CoA deshidrogenasa y carnitina palmitoiltransferasa 2 que participan en la degradación de ácidos grasos (Osorio, 2014) y la sobreexpresión de genes que codifican la fosfolipasa D que genera ácido fosfatídico (Cazzolli *et al.*, 2006), precursor de glicerofosfolípidos y triglicéridos (Athenstaedt y

Daum, 1999), que permitieron la recuperación de las reservas lipídicas durante el crecimiento acelerado.

También disminuyó la expresión de genes relacionados con la biogénesis de los peroxisomas, un orgánulo donde principalmente se localiza la catalasa (Al-Hajaya *et al.*, 2022), lo que coincide con la disminución significativa de la actividad de esta enzima observada durante el CC del camarón. No obstante, la sobre-expresión de genes que codifican las peroxiredoxinas, enzimas reductoras del peróxido de hidrógeno menos eficientes que la catalasa (Handy y Loscalzo, 2012), sugieren la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el crecimiento acelerado. En este sentido, la sobreexpresión de los genes que codifican las proteínas de choque térmico (HSPs) 67B2 y 67B3 en el presente estudio podría estar relacionada con un mecanismo de protección celular frente al posible estrés oxidativo (Kalmar y Greensmith, 2009). Además, la presencia de ROS está relacionada con la activación del sistema inmune (Py *et al.*, 2022). Se ha encontrado que la expresión de la proteína de shock térmico HSP67B2 está vinculada con la respuesta inmune del camarón *Fenneropenaeus chinensis* frente a la infección por *Vibrio anguillarum* (Wang *et al.*, 2013).

Finalmente, durante el CC del camarón también se sobre-expresaron genes que codifican el dominio SMYD4, el cual actúa como un regulador epigenético a través de su actividad dual como metiltransferasa y regulador negativo de la desacetilación de histonas (Xiao *et al.*, 2018). Su expresión puede relacionarse con el mayor porcentaje de ADN metilado observado durante el CC del grupo previamente estresado. Sin embargo, la expresión de los genes que participan en el mismo proceso puede contraponerse, y la sobre-expresión y subexpresión simultánea de genes codificantes de las metiltransferasas del ARNt en el presente estudio, remarcan la importancia de profundizar en los patrones de metilación de *P. vannamei* asociados con la respuesta de crecimiento compensatorio.

9. CONCLUSIONES

- El camarón *Penaeus vannamei* es capaz de compensar por completo su crecimiento después de 3 días de ayuno y variación térmica, mientras que el ayuno prolongado durante 14 días a 30°C afecta irreversiblemente su capacidad de crecimiento compensatorio.
- Periodos cortos de hipertermia incrementan la tasa de crecimiento durante la fase de estrés y el consumo de alimento en esta especie.
- Periodos cortos y prolongados de hipotermia reducen el crecimiento del camarón blanco durante el estrés, sin embargo, es compensado total y parcialmente, respectivamente, cuando la temperatura es restablecida a 28°C.
- La alta densidad de cultivo induce el crecimiento compensatorio del camarón cuando los organismos son transferidos a condiciones con menos densidad, aunque el nivel de respuesta dependió de la duración del cultivo a alta densidad.
- Tras siete días de estrés térmico, la actividad antioxidante en *P. vannamei* se normaliza más rápidamente que tras períodos prolongados, donde se observa una disminución en la actividad superóxido dismutasa por efecto de la hipotermia y un incremento en la actividad de catalasa y glutatión peroxidasa por causa de la hipertermia.
- El estrés generado por la alta densidad de cultivo estimula la movilización de los mecanismos de defensa antioxidante del camarón y su actividad se normaliza cuando los organismos son transferidos a una menor densidad, donde la reducción significativa de la actividad catalasa podría sugerir un estado de homeostasis celular.
- La exposición del camarón *P. vannamei* a estrés térmico durante siete días favorece el uso de lípidos como fuente de energía, asociado con el incremento de la actividad lipasa. Mientras que la preferencia del organismo por los sustratos proteicos se incrementa significativamente por la exposición a períodos prolongados de estrés térmico.
- Se observó un aumento significativo en la actividad de las proteasas como consecuencia del estrés por alta densidad. En cambio, durante la fase de crecimiento compensatorio, la actividad de la quimotripsina y lipasa se eleva, indicando una mayor utilización de proteínas y lípidos para soportar el crecimiento acelerado y satisfacer las demandas energéticas.

- El estrés por alta densidad incrementa la disponibilidad de energía celular (fosfágenos y carga energética) probablemente por un efecto de menor metabolismo asociado a menor movilidad.
- El camarón *P. vannamei* presenta una amplia plasticidad para el uso y movilización de combustibles y reservas energéticas de acuerdo con sus necesidades fisiológicas inducidas por distintos estresores.
- La metilación global del ADN se reduce por efecto de la alta densidad de cultivo; sin embargo, es imprescindible evaluar los patrones de metilación del camarón bajo los distintos estresores.
- La expresión de genes a nivel transcripcional durante el crecimiento compensatorio del camarón blanco es dependiente del tipo de estresor y se relaciona con la respuesta fisiológica.
- Genes vinculados a la apoptosis, metilación, locomoción, transporte intracelular, respuesta inmune, desarrollo de cutícula y regulación de la respiración celular se asocian con este mecanismo, aunque su nivel de expresión varía según el tipo de estresor.

10. LITERATURA CITADA

- Abad-Rosales, S.M., Betancourt-Lozano, M., Vargas-Albores, F. y Roque, A. (2001). Interacción de factores físicos, químicos y biológicos en el cultivo de camarón. En: Ruiz-Luna, A., Berlanga-Robles, C.A. y Betancourt-Lozano, M. (eds). *Avances en acuicultura y manejo ambiental*. Editorial Trillas, México, pp 123-134.
- Abdelrahman, H., Abebe, A. y Boyd, C. (2019). Influence of variation in water temperature on survival, growth and yield of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in inland ponds for low-salinity culture. *Aquaculture Research*, 50: 658-672. doi: 10.1111/are.13943
- Abe, H., Hirai, S. y Okada, S., (2007). Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology – A Molecular and Integrative Physiology*, 146: 40-46. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.027
- Aguilar, V., Racotta, I.S., Goytortúa, E., Wille, M., Sorgeloos, P., Civera, R. y Palacios, E. (2012). The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquaculture Nutrition*, 18: 258-271. doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00892.x
- Aguilar-Medina, V. (2009) *Efecto del ácido araquidónico sobre la susceptibilidad al estrés por alta densidad, la producción de PGE2 y la respuesta inmune del camarón blanco del pacífico Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S., México.
- Ahuejote-Sandoval, M. (2004). *Estrés oxidativo en camarón blanco (Litopenaeus vannamei) en respuesta a hipoxia y reoxigenación*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional – CICIMAR, La Paz, B.C.S., México.
- Al-Hajaya, Y., Karpinska, B., Foyer, C. H. y Baker, A. (2022) Nuclear and peroxisomal targeting of catalase. *Plant, Cell & Environment*, 45: 1096-1108. doi: 10.1111/pce.14262
- Alessio, H. y Hagerman, A. (2006). *Oxidative stress, exercise and aging*. Imperial College Press, London, 184 p.
- Allen, W.V. (1971). Amino acid and fatty acid composition of tissues of the Dungeness crab (*Cancer magister*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28: 1191-1195. doi: 10.1139/f71-175
- Ali, M., Nicieza, A. y Wootton, R.J. (2003). Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4: 147-190. doi: 10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x
- Ali T., Martínez-Llorens, S., Moñino, A.V., Jover, M. y Vidal, T. A. (2016). Effects of weekly feeding frequency and previous ration restriction on the compensatory growth and body composition of Nile tilapia fingerlings. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42: 357-363. doi: 10.1016/j.ejar.2016.06.004
- Anand, P.S.S., Aravind, R., Biju, J.F., Balasubramanian, C.P., Antony, J., Saranya, C., Christina, L., Rajamanickam, S., Panigrahi, A., Ambasankar, K. y Vijayan, K.K. (2021). Nursery rearing of Indian white shrimp *Penaeus indicus*: optimization of dietary protein levels and stocking densities under different management regimes. *Aquaculture*, 542: 736807. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736807
- Andrade, T., Alfonso, A., Pérez-Jiménez, A., Oliva-Teles, A., de las Heras, V., Mancera, J.M., Serradeiro, R. y Costas, B. (2015). Evaluation of different stocking densities in a Senegalese

- sole (*Solea senegalensis*) farm: implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture*, 438: 6-11. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.034
- Anestis, A., Pörtner, H. O., Lazou, A., y Michaelidis, B. (2008). Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: implications for vertical zonation. *Journal of Experimental Biology*, 211: 2889-2898. doi: 10.1242/jeb.016782
- Apún-Molina, J.P., Robles-Romo, A., Alvarez-Ruiz, P., Santamaria-Miranda, A., Arjona, O. y Racotta, I.S. (2017). Influence of stocking density and exposure to white spot syndrome virus in biological performance, metabolic, immune, and bioenergetics response of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 479: 528-537. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.06.027
- Auster, P.J. y Stewart, L.L. (1984). Compensatory growth in the bay scallop, *Argopecten irradians*. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 5: 103-104. ISSN-0250-7408
- Athenstaedt, K. y Daum, G. (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *European Journal of Biochemistry*, 266: 1-16. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00822.x
- Atkinson, D.E. (1968). The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7: 4030-4034. doi: 10.1021/bi00851a033.
- Barnes, H. y Blackstock, J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovainillin method to total lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 12: 103-118. doi: 10.1016/0022-0981(73)90040-3
- Bezerra, D., Días, C.D. y Soares, C. (2019). Performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to different fasting periods. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 2: 1074-1081. ISSN 2595-573X.
- Bi, B., Yuan, Y., Zhao, Y., He, M., Song, H., Kong, L. y Gao, Y. (2023). Effect of crowding stress on growth performance, the antioxidant system and humoral immunity in hybrid sturgeon. *Aquaculture Reports*, 28: 101468. doi: 10.1016/j.aqrep.2023.101468
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 16: 6-21. doi: 10.1101/gad.947102.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E. y Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*, 82: 291-329. doi: 10.1152/physrev.00028.2001.
- Blokhina, O., Viroleinen, E. y Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Annals of Botany*, 91: 179-194. doi: 10.1093/aob/mcf118
- Bosdriesz, E., Wortel, M.T., Haanstra, J.R., Wagner, M.J., de la Torre, C.P. y Teusink, B. (2018). Low affinity uniporter carrier proteins can increase net substrate uptake rate by reducing efflux. *Scientific Reports*, 8: 5576. doi: 10.1038/s41598-018-23528-7
- Bossdorf, O., Richards, C. y Pigliucci, M. (2008). Epigenetics for ecologists. *Ecology Letters*, 11: 106-115. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01130.x
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L. y Lester, L.J. (1990). Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various level of total dietary lipids. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21: 41-52. doi: 10.1111/j.1749-7345.1990.tb00952.x

- Buckup, L., Dutra, B.K., Ribarcki, F.P., Fernandes, F.A., Noro, C.K., Oliveira, G.T. y Vinagre, A.S. (2008). Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea: Decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology – A Molecular and Integrative Physiology*, 149: 59-67. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.10.008
- Campos, C., Valente, L.M.P., Conceição, L.E.C., Engrola, S. y Fernandes, J.M.O. (2013). Temperature affects methylation of the myogenin putative promoter, its expression and muscle cellularity in *Senegalese sole* larvae. *Epigenetics*, 8(4): 389-397. doi: 10.4161/epi.24178
- Cárcamo-Aréchiga, N., Grijalva-Chon, J.M., Hernández-López, J., Varela-Romero, A., López-Torres, M.A. y Medina-Juárez, L.A. (2016). Mecanismo de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infectivo: una revisión. *Biotecnia*, 18(1): 32-42. doi: 10.18633/bt.v18i1.242
- Carvajal, C.C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36: 1. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091 [consulta: 02 septiembre 2024].
- Castro, M.J. y Ordinola-Zapata, A. (2021). La estrategia de ayuno y realimentación, una alternativa viable para optimizar el consumo de alimento balanceado en el cultivo semi-intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5): e19546. doi: 10.15381/rivep.v32i5.19546
- Cazzolli, R., Shemon, A.N., Fang, M.Q. y Hughes, W.E. (2006). Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life*, 58: 457-461. doi: 10.1080/15216540600871142.
- Cedar, H. y Bergman, Y. (2012). Programming of DNA methylation patterns. *Annual Review of Biochemistry*, 81: 97-117. doi: 10.1146/annurev-biochem-052610-091920
- Chen, J.C., Chen, C.T. y Cheng, S.Y. (1994). Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid level in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed at different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Marine Ecology Progress Series*, 110: 85-94. doi: 10.3354/meps110085
- Cheng, W., Wang, L.U., Chen, J.C. (2005). Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 250: 592-601. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.04.060
- Chrousos, G.P. y Gold, P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267(9): 1244-1252. doi: 10.1001/jama.1992.03480090092034
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (2023). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (2023). Disponible en: https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgpppe/2023/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_AC_UACULTURA_Y_PESCA_2023.pdf [consulta: 12 octubre 2024].
- Comoglio, L. I., Gaxiola, G., Roque, A., Cuzon, G. y Amin, O. (2004). The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research*, 23(1): 243-249.

- Covelo-Soto, L., Leunda, P.M., Pérez-Figueroa, A. y Morán, P. (2015). Genome-wide methylation study of diploid and triploid brown trout *Salmo trutta*. *Animal Genetics*, 46: 280-288. doi: 10.1111/age.12287
- Cui, K., Wang, B., Ma, T., Si, B.W., Zhang, N.F., Tu, Y. y Diao, Q.Y. (2018). Effects of dietary protein restriction followed by realimentation on growth performance and liver transcriptome alterations of lamb. *Scientific Reports*, 8: 15185. doi: 10.1038/s41598-018-33407-w
- Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G. y Wormhoudt, A. (2000). Utilization of carbohydrates by shrimp. En: *Avances en Nutrición Acuícola*. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.
- Dar, S.A., Srivastava, P.P., Varghese, T., Rasool, S.I., Anand, G., Gupta, S., Krishna, G. (2018). Regulation of compensatory growth by molecular mechanism in *Labeo rohita* juveniles under different feeding regimes. *General and Comparative Endocrinology*, 261: 89-96. doi: 10.1016/j.ygcen.2018.01.029
- De, P., Dey, N. y Leyland-Jones, B. (2013). Growth factor and signaling networks. En: *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second edition)*. Academic Press, USA, pp. 365-369.
- de la Peña, M.V., Piskobulu, V., Murgatroyd, C. y Hager, R. (2021). DNA methylation patterns respond to thermal stress in the viviparous cockroach *Diploptera punctata*. *Epigenetics*, 16: 313-326. doi: 10.1080/15592294.2020.1795603
- Del Mar, E., Largman, C, Brodick, J. y Geokas, M. (1979). A sensitive new substrate for hymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, 99: 316-320. doi: 10.1016/S0003-2697(79)80013-5
- Delgado, I., Fresnedo, O., Iglesias, A., Rueda, Y., Syn, W., Zubiaga, A.M. y Ochoa, B. (2011). A role for transcription factor E2F2 in hepatocyte proliferation and timely liver regeneration. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(1): G20-G31. doi: 10.1152/ajpgi.00481.2010
- Dobson, S. y Holmes, R. (1984). Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdieri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 25(6): 649-656. doi: 10.1111/j.1095-8649.1984.tb04911.x
- Duncan, E., Gluckman, P. y Dearden, P. (2014). Epigenetics, plasticity, and evolution: how do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of Experimental Zoology - B Molecular and Developmental Evolution*, 322: 208-220. doi: 10.1002/jez.b.22571
- Dyck L.V., Pearce, D.A. y Sherman, F. (1994). PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1): 238-42. doi: 10.1016/S0021-9258(17)42340-4
- England, W. R. and Baldwin, J. (1983). Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. *Physiological Zoology*, 56(4): 614-622. doi: 10.1086/physzool.56.4.30155884
- Erlanger, B., Kokowsky, N. y Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278. doi: 10.1016/0003-9861(61)90145-X
- Estrada-Cárdenas, P., Cruz-Moreno, D.G., González-Ruiz, R., Peregrino-Uriarte, A.B., Leyva-Carrillo, L., Camacho-Jiménez, L., Quintero-Reyes, I. y Yepiz-Plascencia, G. (2021). Combined hypoxia and high temperature affect differentially the response of antioxidants enzymes, glutathione and hydrogen peroxide in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

- Comparative Biochemistry and Physiology – A Molecular and Integrative Physiology*, 254: 110909. doi: 10.1016/j.cbpa.2021.110909
- Fanjul-Moles, M.L. y Gonsebatt, M.E. (2012). Oxidative stress and antioxidant systems in crustacean life cycles. En: Abele, D., Vázquez-Medina, J.P. y Zenteno-Savín, T. (eds). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*. Blackwell, Oxford. pp 208-223. doi: 10.1002/9781444345988.ch15
- FAO. (2009). *Cultured aquatic species fact sheets: Penaeus vannamei*. Disponible en: https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_whitelegshrimp.htm [consulta: 2 agosto 2020].
- FAO. (2014). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Disponible en: <https://doi.org/978-92-5-308275-9> ISNN1020-5500 [consulta: 17 mayo 2021].
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Disponible en: <http://www.fao.org/3/i5555s/i5555s> [consulta: 17 mayo 2021].
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/ca9229es> [consulta: 9 octubre 2020].
- FAO. (2024). *The state of world fisheries and aquaculture. Blue transformation in action*. Disponible en: <https://www.fao.org/publications/home/fao-flagship-publications/the-state-of-world-fisheries-and-aquaculture> [consulta: 07 junio 2024].
- Fóes, G., Krummenauer, D., Lara, G., Poersch, L. y Wasielesky, W. (2016). Long term storage and the compensatory growth of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in aquaculture ponds. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(3): 588-594. doi: 10.3856/vol44-issue3-fulltext-17
- Gao, Y., He, Z., Vector, H., Zhao, B., Li, Z., He, J., Jeong-Yeol, L. y Chu, Z. (2017). Effect of stocking density on growth, oxidative stress and HSP 70 of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 17: 877-884. doi: 10.4194/1303-2712-v17_5_04
- Gavery, M.R. y Roberts, S.B. (2017). Epigenetic considerations in aquaculture. *PeerJ*, 5: e4147. doi: 10.7717/peerj.4147
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E. y Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomości Lekarskie*, 57(9-10): 453-455. PMID: 15765761.
- Giannatassio, S., Gagliardi, S., Samaja, M. y Marra, E. (2003). Simultaneous determination of purine nucleotides, their metabolites and β -nicotinamide adenine dinucleotide in cerebellar granule cells by ion-pair high performance liquid chromatography. *Brain Research Protocols*, 10: 168-174. doi: 10.1016/S1385-299X(02)00215-5
- Goll, M.G. y Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74: 481-514. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721
- González C.J. (2000). Fosforilación en células eucarióticas: Papel de fosfatasa y quinasas en la biología, patogenia y control de protozoosis tisulares y sanguíneas. *Revista Médica de Chile*, 128(10): 1150-1160. doi: 10.4067/S0034-98872000001000012
- Guppy, M., Fuery, C. J. y Flanigan, J. E. (1994). Biochemical principles of metabolic depression. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 109: 175-189. doi: 10.1016/0305-0491(94)90001-9

- Hall, M.R. y Van Ham, E.H. (1998). The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(3): 290-299. doi: 10.1111/j.1749-7345.1998.tb00649.x
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5): 531-542. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.008
- Han, B., Li, W., Chen, Z., Xu, Q., Luo, J., Shi, Y., Li, X., Yan, X. y Zhang, J. (2016). Variation of DNA methylome of zebrafish cells under cold pressure. *PLoS ONE*, 11: e0160358. doi: 10.1371/journal.pone.0160358
- Handy, D. y Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11): 1323-1367. doi: 10.1089/ars.2011.4123
- Haroun, R., Makol, A., Ojeda, J. y Simard, F. (2011). *Guía para el desarrollo sostenible de la acuicultura mediterránea: interacciones entre la acuicultura y el medio ambiente*. UICN, Gland, Suiza y Málaga, España. 114 p.
- Hayward R.S., Wang, N. y Noltie, D.B. (2000). Group holding impedes compensatory growth of hybrid sunfish. *Aquaculture*, 183: 299-305. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00301-4
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., y Ma, X. (2017). Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2): 532-553. doi: 10.1159/000485089
- He, L., Pei, Y., Jiang, Y., Li, Y., Liao, L., Zhu, Z. y Wang, Y. (2015). Global gene expression patterns of grass carp following compensatory growth. *BMC Genomics*, 16: 184. doi: 10.1186/s12864-015-1427-2
- Hostins, B., Braga, A., Lopes, D.L.A., Wasielesky, W. y Poersch, L.H. (2015). Effect of temperature on nursery and compensatory growth of pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* reared in a super-intensive biofloc system. *Aquacultural Engineering*, 66: 62-67. doi: 10.1016/j.aquaeng.2015.03.002
- Houlihan, D. F., Waring, C. P., Mathers, E. y Gray, C. (1990). Protein synthesis and oxygen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after a meal. *Physiological Zoology*, 63(4): 735-756. doi: 10.1086/physzool.63.4.30158174
- Huang, D.W., Sherman B.T. y Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1): 44-57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
- Huang, Y.J., Wen, H.S., Zhang, M.Z., Hu, N., Si, Y.F., Li, S.P. y He, F. (2018). The DNA methylation status of MyoD and IGF-I genes are correlated with muscle growth during different developmental stages of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 219: 33-43. doi: 10.1016/j.cbpb.2018.02.005
- Instituto Nacional de Pesca. (2018). *Acuicultura: camarón blanco del Pacífico*. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico> [consulta: 9 agosto 2020].
- Jia, X.Y., Zhong, D.S., Zhang, D., Wang, F. y Zhou, W.L. (2018). Energy metabolic enzyme responses of *Litopenaeus vannamei* to thermal stress: a comparative study in freshwater and seawater conditions. *Aquaculture International*, 26: 1067-1081. doi: 10.1007/s10499-018-0268-9

- Jiang, D.H., Lawrence, A.L., Neill, W.H. y Gong, H. (2000). Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 253(2): 193-209. doi: 10.1016/S0022-0981(00)00259-8
- Jiang, Q., Qian, L., Gu, S., Guo, X., Zhang, X. y Sun, L. (2020). Investigation of growth retardation in *Macrobrachium rosenbergi* based on genetic/epigenetic variation and molt performance. *Comparative Biochemistry and Physiology – D Genomics and Proteomics*, 35: 100683. doi: 10.1016/j.cbd.2020.100683
- Jiang, S., Zhou, F., Yang, Q., Huang, J., Yang, L. y Jiang, S. (2019). Impact of temperature stress on oxygen and energy metabolism in the hepatopancreas of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 51: 141-148. doi: 10.17582/journal.pjz/2019.51.1.141.148
- Jin, C., Zhuo, Y., Wang, J., Zhao, Y., Xuan, Y.D., Mou, D.L., Liu, H., Zhou, P., Fang, Z.F., Che, L.Q., Xu, S.Y., Feng, B., Li, J., Jiang, X.M., Lin, Y. y Wu, D. (2018). Methyl donors dietary supplementation to gestating sows diet improves the growth rate of offspring and is associating with changes in expression and DNA methylation of insulin-like growth factor-1 gene. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102: 1340-1350. doi: 10.1111/jpn.12933
- Jiwyam, W. (2010). Growth and compensatory growth of juvenile *Pangasius bocourti* Sauvage, 1880 relative to ration. *Aquaculture*, 306: 393-397. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.005
- Kalmar, B. y Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(4): 310-318. doi: 10.1016/j.addr.2009.02.003
- Kang, B.K. y Spaziani, E. (1995). Uptake of high-density lipoprotein by Y-organ of the crab *Cancer antennarius*: III. Evidence for adsorptive endocytosis and the absence of lysosomal processing. *Journal of Experimental Zoology*, 273: 425-433. doi: 10.1002/jez.1402730506
- Kemp, B. E., Stapleton, D., Campbell, D. J., Chen, Z. P., Murthy, S., Walter, M., Gupta, A., Adams, J. J., Katsis, F., van Denderen, B., Jennings, I.G., Iseli, T., Michell, B.J. y Witters, L.A. (2002). AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society Transactions*, 31: 162-168. doi: 10.1042/bst0310162
- Kumlu, M. y Erol Dogan, T. (2000). Effects of temperature and substrate on growth and survival of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae) postlarvae. *Turkish Journal of Zoology*, 24: 337-341. Disponible en: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol24/iss3/14/> [consulta: 21 junio 2021].
- Kumlu, M., Erol Dogan, O.T. y Aktas, M. (2000). Effects of temperature and salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus*. *Aquaculture*, 188: 167-173. doi: 10.1651/C-2379
- León, M.L., Cedeño, R., Rivero, R.J., Rivero, J., García, D.L. y Bordón, L. (2018). La teoría del estrés oxidativo como causa del envejecimiento celular. *MediSur*. 16(5): 699-710. ISSN 1727-897X.
- Levine, R.L., Moskovitz, J. y Stadtman, E.R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life*. 50: 301-307 doi: 10.1080/713803735
- Lin, Y., Chen, J., Nursafura, S., Sabidii, W., Shahrir, A., Cheng, S. y Hsu, C. (2012). Modulation of innate immunity and gene expressions in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following

- long-term starvation and re-feeding. *Results in Immunology*, 2: 148-156. doi: 10.1016/j.rinim.2012.07.001
- Lin, Y.C., Vaseeharan, B. y Chen, J.C. (2008). Molecular cloning and phylogenetic analysis on $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 317-329. doi: 10.1016/j.rinim.2012.07.001
- Liu, C.H. y Chen, J.C. (2004). Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 16: 321-334. doi: 10.1016/S1050-4648(03)00113-X
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method. *Methods*, 25(4): 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Luna-Pinto, G. y Cronjé, P. (2000). The roles of the insulin-like growth factor system and leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age of puberty and compensatory growth in dairy heifers. *South African Journal of Animal Science*, 30: 155-163. doi: 10.4314/sajas.v30i2.3865
- Luo, S., Wang, Z., Li, X., Onchari, M.M., Song, Ch., Yuan, X., Li, W., John, C.K., Zhang, T., Lek, S. y Jin, S. (2021). Feed deprivation over 16 days followed by refeeding until 75 days fails to elicit full compensation of *Procambrus clarkii*. *Aquaculture*, 547: 737490. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737490
- Mai, W.J., Yan, J.L., Wang, L., Zheng, Y., Xin, Y. y Wang, W.N. (2010). Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. *Aquatic Toxicology*, 100: 271-281. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.07.025
- Martin, J.L.M., Verán, Y., Guelorget, O. y Pham, D. (1998). Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. *Aquaculture*, 164: 135-149. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00182-3
- Martínez-Canto, O., Olgúin-Monroy, N.O., de Anda-Montañez, J.A. y Zenteno-Savín, T. (2013). Spatial and temporal variability of oxidative stress indicators in the red crab (*Peuronicodes planipes*) from the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Ciencias Marinas*, 39(1): 41-53. doi: 10.7773/cm.v39i1.2153
- Martínez-Cayuela, M. (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*, 39: 5-18. Disponible en: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5991> [consulta: 18 marzo 2023].
- Martínez-Córdova, L.R. (1999). *Cultivo de camarones peneidos: principios y prácticas*. 1^{ra} ed. AGT Editor, México. 290 pp.
- Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M. y Cortés-Jacinto, E. (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(3): 181-196. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37012012006> [consulta: 12 mayo 2021].
- Marques, H.L. y Lombardi, J.V. (2011). Compensatory growth of Malaysian prawns reared at high densities during the nursery phase. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(4): 701-707. doi: 10.1590/S1516-35982011000400001
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, A., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R. y Racotta, I.S. (2006). Metabolic and immune responses in Pacific whitleg shrimp

- Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*, 258: 633-640. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.036
- Miranda-Filho, K.C., Leães-Pinho Jr., G.L., Wasielesky Jr., W. y Bianchini, A. (2009). Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 150(3): 377-382. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.06.001
- Metzger, D.C.H. y Schulte, P.M. (2017). Persistent and plastic effects of temperature on DNA methylation across the genome of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Proceedings of the Royal Society – B Biological Sciences*, 284(1864): 20171667. doi: 10.1098/rspb.2017.1667
- Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F. y Daniel, J.Y. (1989). Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography. *Comparative Biochemistry and Physiology – B Comparative Biochemistry*, 93: 307-316. doi: 10.1016/0305-0491(89)90086-2
- Moghadam, H., Morkore, T. y Robinson, N. (2015). Epigenetics-potential for programming fish for aquaculture? *Journal of Marine Science and Engineering*, 3(2): 175-192. doi: 10.3390/jmse3020175
- Morris, S., Aardt, W.J. y Ahern, M.D. (2005). The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia. *Aquatic Toxicology*, 75: 16-31. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.07.001
- Mugnier, C., Zipper, E., Goarant, C. y Lemonnier, H. (2008). Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus vannamei* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*, 274: 398-407. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.033
- Muhlia-Almazán, A. y García-Carreño, F.L. (2002). Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology – B Biochemistry and Molecular Biology*, 133: 383-394. doi: 10.1016/S1096-4959(02)00163-X
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L. y Piferrer, F. (2011). DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genetics*, 7: e1002447. doi: 10.1371/journal.pgen.1002447
- Navas, L.E. y Carnero, A. (2021). NAD⁺ metabolism, stemness, the immune response, and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6: 2. doi: 10.1038/s41392-020-00354-w
- Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N. y Bhattarai H.K. (2019). ATP synthase: structure, function and inhibition. *Biomolecular Concepts*, 10: 1-10 doi: 10.1515/bmc-2019-0001
- Nga, B.T., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M., Roijackers, R., S. Sheffer, M. y Nghia, T.T. (2005). Chemical and physical effects of crowding on growth and survival of *Penaeus monodon* Fabricius post-larvae. *Aquaculture*, 246: 455-465. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.02.026
- Nolasco-Soria, H., Moyano-López, F., Vega-Villasante, F., del Monte-Martínez, A., Espinosa-Chaurand, D., Gisbert, E. y Nolasco-Alzaga, H.R. (2018). Lipase and phospholipase activity methods for marine organisms. En: Sandoval, G. (eds). *Lipases and Phospholipases*. Methods in Molecular Biology, vol 1835. Humana Press, New York, NY. pp 139-167. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_7

- Oliveira, G.T., Fernandes, F.A., Bond-Buckup, G., Bueno, A.A. y Silva, R.S.M. (2003). Circadian and seasonal variations of the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). En: Lemaitre, R. y Tudge, C.C. (eds). *Biology of the Anomura*. Memoirs of Museum Victoria. 60(1): 59-62. doi: 10.24199/j.mmv.2003.60.8
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C.C. y Da Silva, R.S.M. (2001). Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Marine Biology*, 139(2): 335-342. doi: 10.1007/s002270100569
- Osorio, J.H. (2014). Estudio de la deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga con cardiomiopatía mediante el uso de un sustrato deuterado. *Iatreia*, 27(4): 410-416. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-07932014000400004&script=sci_abstract&tlng=es [consulta: 13 noviembre 2023].
- Parrilla-Taylor, D.P. y Zenteno-Sabín, T. (2011). Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture*, 318(4): 379-383. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.05.015
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G. y Rosas, C. (2003). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*, 218: 637-650. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00300-9
- Peixoto, S., Silva, E., Costa, C.B., Nery, R.C., Rodrigues, F., Silva, J.F., Bezerra, R. y Soares, R. (2017). Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus vannamei* during nursery phase in biofloc system. *Aquaculture Nutrition*, 24: 579-585. doi: 10.1111/anu.12591
- Pérez-Rostro, C.I., Racotta, I.S. e Ibarra, A.M. (2004). Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2): 189-200. doi: 10.1016/j.jembe.2003.10.010
- Pigliucci, M. (1996). How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends in Ecology and Evolution*, 11: 168-173. doi: 10.1016/0169-5347(96)10008-2
- Pinhel, M.A., Nakazone, M.A., Cação, J.C., Piteri, R., Dantas, R.T., Godoy, M.F., Godoy, M.R.P., Tognola, W.A., Conforti-Froes, N.D.T. y Souza, D. (2008). Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: Association study and relationship with apolipoprotein. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(4): 439-445. doi: 10.1515/CCLM.2008.102
- Pinti, M., Gibellini, L., Nasi, M., De Basi, S., Bortolotti, C.A., Iannone, A. y Cossarizza, A. (2016). Emerging of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 1857(8): 1300-1306. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.025
- Poblete-Abuter, E. (2010). *Análisis de la expresión de genes implicados en el crecimiento muscular del lenguado chileno (Paralichthys adspersus): efecto de la restricción nutricional y el crecimiento compensatorio*. Tesis Doctoral. Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.
- Poljsak, B. (2016). NAD+ in cancer prevention and treatment: pros and cons. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, 5: 4. doi: 10.4172/2324-9110.1000165

- Ponce-Palafox, I., Martínez-Palacios, C.A. y Ross, L.G. (1997). The effect of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Aquaculture*, 157: 107-115. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00148-8
- Ponce-Palafox, J.T., Alcalá, P.A., Mendoza, L.D.G., Arredondo-Figueroa, J.L., Lango-Reynoso, F., Castañeda-Chávez, M.R., Esparza-Leal, H., Ruiz-Luna, A., Páez-Ozuna, F., Castillo-Vargasmachuca, S.G. y Peraza-Gómez, V. (2019). Response surface analysis of temperature-salinity interaction effects on water quality, growth and survival of shrimp *Penaeus vannamei* postlarvae raised in biofloc intensive nursery production. *Aquaculture*, 503:312-321. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.020
- Prates, E., Holanda, M. y Wasielesky, W. (2020). Evaluación del crecimiento compensatorio de camarones blancos del Pacífico en un sistema biofloc. Disponible en: <https://www.aquaculturealliance.org> [consulta: 11 mayo 2021].
- Py, C., Elizondo-González, R. y Peña-Rodríguez, A. (2022). Compensatory growth: fitness cost in farmed fish and crustaceans. *Reviews in Aquaculture*, 00:1-29. doi: 10.1111/raq.12656
- Py, C.A., Sicard, M.T., Elizondo-González, R., Ulaje, S.A., Barajas-Sandoval, D. y Peña-Rodríguez, A. (2024). Response to hyperthermia and hypoxia stress during compensatory growth in *Penaeus vannamei*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 24(8): TRJFAS25313. doi: 10.4194/TRJFAS25313
- Qian, Z., Liu, T., Liu, Q., He, S., Liu, Y., Hou, F., Wang, X. y Mi, X. (2014). P53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology – C Toxicology and Pharmacology*, 159: 38-51. doi: 10.1016/j.cbpc.2013.09.009
- Racotta, I.S. y Hernández-Herrera, R. (2000). Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology – A Molecular and Integrative Physiology*, 125(4): 437-443. doi: 10.1016/s1095-6433(00)00171-9
- Racotta, I.S. y Palacios, E. (1998). Haemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29: 351-356. doi: 10.1111/j.1749-7345.1998.tb00658.x
- Ramírez, A., Reyes, T., Liberona, L., Bustamante, A., Sáez, C. y Borzone, G. (2007). Metabolismo del glutatión y desarrollo posnatal del pulmón de la rata. *Revista Médica de Chile*, 135(7): 896-903. doi: 10.4067/S0034-98872007000700010
- Re, A.D., Díaz, F., Ponce-Rivas, E., Giffard, I., Muñoz-Marquez, M.E. y Sigala-Andrade, H.M. (2012). Combined effect of temperature and salinity on the thermotolerance and osmotic pressure of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Journal of Thermal Biology*, 37(6): 413-418. doi: 10.1016/j.jtherbio.2012.04.004
- Reipschlager, A. y Pörtner, H. O. (1996). Metabolic depression during environmental stress: the role of extracellular versus intracellular pH in *Sipunculus nudus*. *Journal of Experimental Biology*, 199: 1801-1807. doi: 10.1242/jeb.199.8.1801
- Ren, X., Wang, Q., Shao, H., Xu, Y., Liu, P. y Li, J. (2021). Effects of low temperature on shrimp and crab physiology, behavior, and growth: a review. *Frontiers in Marine Science*, 8: 746177. doi: 10.3389/fmars.2021.746177
- Reynaud, Y. (2008). *Identification de marqueurs génétiques de la virulence chez Vibrio nigripulchritudo, un pathogène de crevettes péneïdes en Nouvelle-Calédonie. Thèse de Doctorat.* Université de Paris 6- Pierre et Marie Curie, Paris.

- Robles-Romo, A., Arjona, O. y Racotta, I.S. (2014). Influence of sampling, storage, processing and optimal experimental conditions on adenylate energy charge in penaeid shrimp. *Archives of Biological Sciences*, 66: 651-666. doi: 10.2298/ABS1402651R
- Rocha, J., Silva, J., Barros, C., Peixoto, S. y Soares, R. (2019). Compensatory growth and digestive enzyme activity of *Litopenaeus vannamei* submitted to feeding restriction in a biofloc system. *Aquaculture Research*, 50: 3653-3662. doi: 10.1111/are.14323
- Rojas, A.A., Haws, M.C. y Cabanillas, J.A., Eds. (2005). *Buenas prácticas de manejo para el cultivo de camarón. Prácticas de desarrollo sostenible en ambientes costeros de prioridad de los ecosistemas del Golfo de California. Camaronicultura*. Disponible en: https://www.crc.uri.edu/download/PKD_good_mgt_field_manual.pdf [consulta: 18 junio 2021].
- Rosas, C., Bolongaro-Crevenna, A., Sánchez, A., Gaxiola, G., Soto, L. y Escobar, E. (1995). Role of the digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *The Biological Bulletin*, 189: 168-174. doi: 10.2307/1542467
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L. y Van Wormhoudt, A. (2002). An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268: 47-67. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00370-7
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Priol, Y.L., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez, A. y Wormhoudt, A.V. (2001). Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259: 1-22. doi: 10.1016/S0022-0981(01)00222-2
- Rubio-Gastélum, T., Valenzuela-Quiñónes, W., Parra-Bracamonte, G.M. y Santamaría-Miranda, A. (2014). Respuesta de metabolitos en hemolinfa y desempeño productivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* cultivado a altas densidades en laboratorio. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49: 601-606. doi: 10.4067/S0718-19572014000300017
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G. y Rosas, C. (2001). Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198: 13-28. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00576-7
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Hernández-López, J. y Yepiz-Plascencia, G. (2006). Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 241-249. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.01.002
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A. y Yepiz-Plascencia, G. (2007). Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340: 184-193. doi: 10.1016/j.jembe.2006.09.006
- Shan, H.W., Geng, Z.X., Ma, S. y Wang, T. (2019). Comparative study of the key enzymes and biochemical substances involved in the energy metabolism of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, with different ammonia-N tolerances. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 221: 73-81. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.04.001.

- Shao, J.Ch., Zhu, W.Q., Liu, M., Wang, L. y Zhao, W. (2020). Cyclical fasting and refeeding is not advisable feeding strategy for white shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Reports*, 18: 100429. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100429
- Sherman, B.T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X, Baseler, M.W., Lane, H.C., Imamichi, T. y Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1): W216-W221. doi: 10.1093/nar/gkac194
- Shi, L. y Tu, B.O. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology*, 33: 125-131. doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.003
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7
- Sokolova, I.M. y Lannig, G. (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research*, 37: 181-201. doi: 10.3354/cr00764
- Speed, S.R., Baldwin, J., Wong, R.J. y Wells, R.M.G. (2001). Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*, and responses to emersion during simulated live transport. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 128: 435-444. doi: 10.1016/S1096-4959(00)00340-7
- Srere, P.A. (1959). The citrate cleavage enzyme: I. Distribution and purification. *Journal of Biological Chemistry*, 234: 2544-2547. doi: 10.1016/S0021-9258(18)69735-2
- Suárez-García, L., Fuentes-Rodríguez, J.M., Torres-Hernández, M. y López-Domínguez, S. (2004). Efecto de la restricción alimenticia sobre el comportamiento productivo de pollos de engorda. *Revista Agraria - Nueva Época*. 1(3): 24-30.
- Sun, D., Li, Q. y Yu, H. (2022). DNA methylation differences between male and female gonads of the oyster reveal the role of epigenetics in sex determination. *Gene*, 820: 146260. doi: 10.1016/j.gene.2022.146260
- Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N. y Smuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long list of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7): e21800. doi: 10.1371/journal.pone.0021800
- Stadtman, E.R., Moskovitz, J. y Levine, R.L. (2003). Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxidant & Redox Signaling*, 5: 577-582. doi: 10.1089/152308603770310239
- Steinberg, C.E.W. (2018). Dietary restriction, starvation, compensatory growth – ‘short-term fasting does not kill you: It can make you stronger’. En: Steinberg, C.E.W. (ed). *Aquatic animal nutrition*. Springer Nature Switzerland AG, Cham, Switzerland, pp 137-287. doi: 10.1007/978-3-319-91767-2_4
- Thibodeaux, L.K., Burnett, K.G. y Burnett, L.E. (2009). Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *Journal of Experimental Biology*, 212: 3428-3439. doi: 10.1242/jeb.033431
- Tidwell, J.H. y Allan, G.L. (2001). Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries. *EMBO Reports*, 21: 958-963. doi: 10.1093/embo-reports/kve236

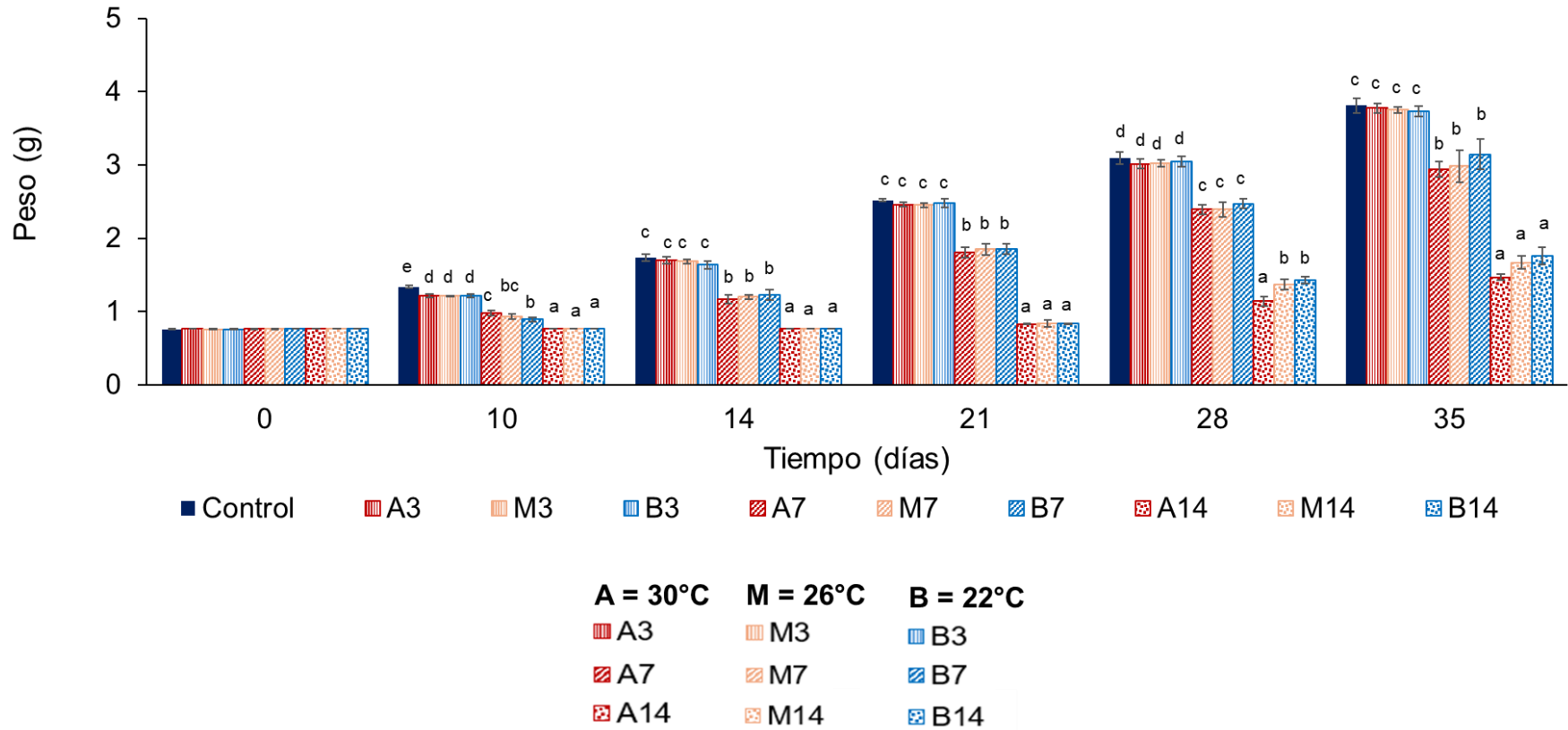
- Treece, G. y Yates, M. (1993). Manual de laboratorio para el cultivo de larvas de camarón peneido. Texas H&M University, USA. 83 p.
- Ulaje-Fernández, S.A. (2015). *Relación entre las respuestas fisiológicas, contenido bioquímico y expresión del camarón blanco (Litopenaeus vannamei) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia. Tesis de Maestría.* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S., México.
- Ulaje, S.A., Rojo-Arreola, L., Lluch-Cota, S.E., Ascencio, F., Cruz-Hernández, P. y Sicard, M.T. (2019). Gene expression and energetic metabolism changes in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to short-term hypoxia. *Aquaculture Research*, 1-11. doi: 10.1111/are.13960
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D. y Flohé, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*, 252: 38-53. doi: 10.1016/0076-6879(95)52007-4
- Uzunoğlu, S., Acar, H., Okudan, N., Gökbil, H., Mevlitoğlu, I. y Sari, F. (2006). Evaluation of the association between null genotypes of glutathione-S-transferases and Behcet's disease. *Archives of Dermatological Research*, 297: 289-293. doi: 10.1007/s00403-005-0617-1
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T., Mazura, M. y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39: 44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Valverde-Moya, J. y Alfaro-Montoya, J. (2015). Compensatory growth and production of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Costa Rica, during the maternity, development and grow-out commercial phases. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*, 7: 99-15. doi: 10.15359/revmar.7.7
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*, 11: 256-265. doi: 10.1016/0003-2697(65)90013-8
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H. y Civera, R. (1993). The digestive enzymes of the pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*: properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Comparative Biochemistry*, 106(3): 547-550. doi: 10.1016/0305-0491(93)90130-W
- Velázquez, M.P., Davis, D.A., Roy, L.A. y Felix, M.L.G. (2012). Effects of water temperature and Na+K+ ratio on physiological and production parameters of *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity water. *Aquaculture*, 343: 13-17. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.02.008
- Venkatesh, B., Tay, B.H., Elgar, G. y Brenner, S. (1996). Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *Journal of Molecular Biology*, 259: 655-665. doi: 10.1006/jmbi.1996.0347
- Venney C.J., Johansson, M.L. y Heath, D.D. (2016). Inbreeding effects on gene-specific DNA methylation among tissues of Chinook salmon. *Molecular Ecology*, 25: 4521-4533. doi: 10.1111/mec.13777
- Wang, D., Li, S. y Li, F. (2013). Screening of genes regulated by relish in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 41: 209-216. doi: 10.1016/j.dci.2013.06.003
- Wang, T., Li, W., Shan, H. y Ma, S. (2021). Responses of energy homeostasis and lipid metabolism in *Penaeus vannamei* exposed to ammonia stress. *Aquaculture*, 544: 737092. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737092

- Wang, Y.C., Chang, P.S. y Chen, H.Y. (2007). Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 1161-1177. doi: 10.1016/j.fsi.2007.04.004
- Wasieliesky, Jr. W., Froes, C., Fóes, G., Krummenauer, D., Lara, G. y Poersch, L. (2013). Nursery of *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: the effect of stocking densities and compensatory growth. *Journal of Shellfish Research*, 32: 799-806. doi: 10.2983/035.032.0323
- Wendelaar-Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 591-625. doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.591
- Winder, W.W. y Hardie, D.G. (1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in Type 2 diabetes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 277(1): E1-E10. doi: 10.1152/ajpendo.1999.277.1.E1
- Won, E.T. y Borski, R.J. (2013). Endocrine regulation of compensatory growth in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 4: 74. doi: 10.3389/fendo.2013.00074
- Wu, L. y Dong, S. (2002). Effects of protein restriction with subsequent realimentation on growth performance of juvenile Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Aquaculture*, 210: 343-358. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00860-2
- Wu, L., Dong, S., Wang, F., Tian, X. y Ma, S. (2001). The effect of previous feeding regimes on the compensatory growth response in chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Crustacean Biology*, 21(3): 559-565. doi: 10.1163/20021975-99990157
- Wyban, J., Walsh, W.A. y Godin, D.M. (1995). Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 138: 267-279. doi: 10.1016/0044-8486(95)00032-1
- Wynn, J.P., Hamid, A.A., Li, Y. y Colin, R. (2001). Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 147: 2857-2864. doi: 10.1099/00221287-147-10-2857
- Xiao, D., Wang, H., Hao, L., Guo, X., Ma, X., Qian, Y., Chen, H., Ma, J., Zhang, J., Sheng, W., Shou, W., Huang, G. y Ma, D. (2018) The roles of SMYD4 in epigenetic regulation of cardiac development in zebrafish. *PLoS Genetics*, 14(8): e1007578. doi: 10.1371/journal.pgen.1007578
- Yaku, K., Okabe, K., Hikosaka, K. y Nakagawa, T. (2018). NAD metabolism in cancer therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 8: 622. doi: 10.3389/fonc.2018.00622
- Yan, B., Wang, X. y Cao, M. (2007). Effects of salinity and temperature on survival, growth, and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shellfish Research*, 26(1): 141-146. doi: 10.2983/0730-8000(2007)26[141:EOSATO]2.0.CO;2
- Yang, W., Dong, S., Yang, J., Mohamed, H., Shah, A.M., Nazir, Y., Gao, X., Fan, H. y Song, Y. (2021). Molecular mechanism of citrate transporter CT in filamentous fungus *Mucor circinelloides* WJ11. *Frontiers in Microbiology*, 12: 673881. doi: fmicb.2021.673881
- Yildirim, M. y Aktas, M. (2018). Could the growth of *Litopenaeus vannamei* be compensated by long-term cyclic feed deprivation and following refeeding? *Journal of Applied Aquaculture*, 31(3): 224-235. doi: 10.1080/10454438.2018.1536007
- Yoshida, Y., Umeno, A. y Shichiri, M. (2012). Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52(1): 9-16. doi: 10.3164/jcbrn.12-112

- Yuan, Q., Qian, J., Ren, Y., Zhang, T., Li, Z. y Liu, J. (2018). Effects of stocking density and water temperature on survival and growth of the juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, reared under laboratory conditions. *Aquaculture*, 495: 631-636. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.029.
- Zhang, P., Zhang, X., Li, J. y Gao, T. (2010). Effect of refeeding on the growth and digestive enzyme activities of *Fenneropenaeus chinensis* juveniles exposed to different periods of food deprivation. *Aquaculture International*, 18: 1191-1203. doi: 10.1007/s10499-010-9333-8
- Zhang, S., Dong, S. L. y Wang, F. (1998). Studies on the bioenergetics of *Penaeus chinensis*, II. Effects of temperature and body weight on energy budget. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 28(2): 228-232.
- Zhang, X., Yuan, J., Li, F. y Xiang, J. (2021). Chitin synthesis and degradation in crustaceans: a genomic view and application. *Marine Drugs*, 19(3): 153. doi: 10.3390/md19030153
- Zhang, X., Yuan, J., Zhang, X., Liu, C., Li, F. y Xiang, J. (2019). Genome-wide identification and expression profiles of myosin genes in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Frontiers in Physiology*, 10: 610. doi: 10.3389/fphys.2019.00610
- Zhang, Y. y Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development*, 15: 2343-2360. doi: 10.1101/gad.927301
- Zhu, W., Yang, C., Liu, Q., Peng, M., Li, Q., Wang, H., Chen, X., Zhang, B., Feng, P., Chen, T., Zeng, D. y Zhao, Y. (2023). Integrated analysis of DNA methylome and transcriptome reveals epigenetic regulation of cold tolerance in *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24: 11573. doi: 10.3390/ijms241411573
- Zhu, Z., Lin, X., Pan, J. y Xu, Z. (2016). Effect of cyclical feeding on compensatory growth, nitrogen and phosphorus budgets in juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 47: 283-289. doi: 10.1111/are.12490

11. ANEXOS

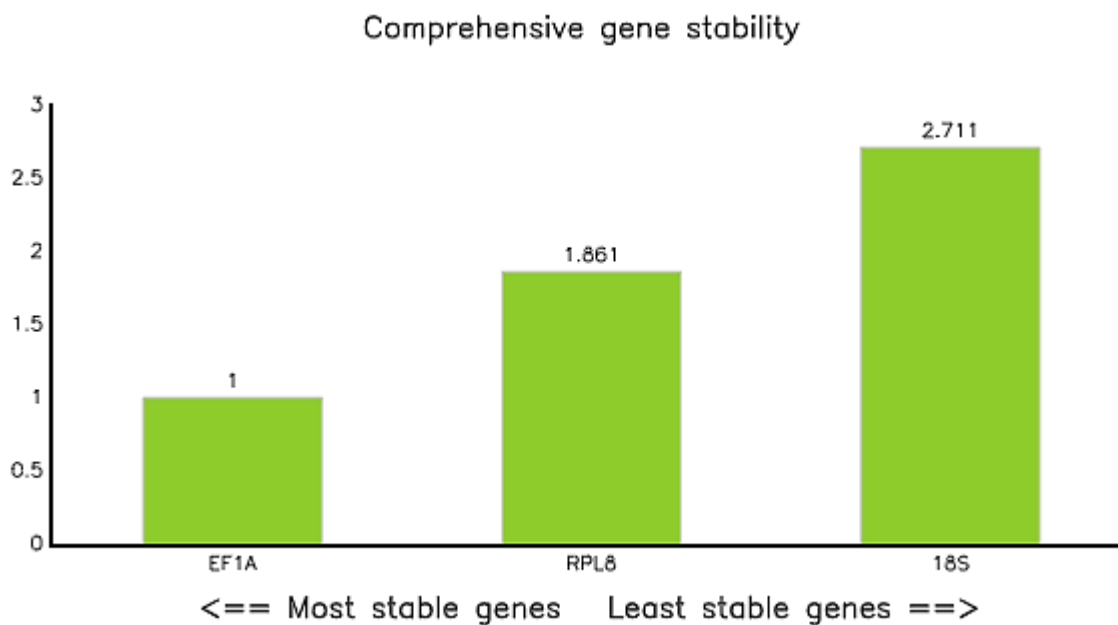
Anexo A. Cinética de crecimiento de *Penaeus vannamei* expuesto a periodos de ayuno y temperatura



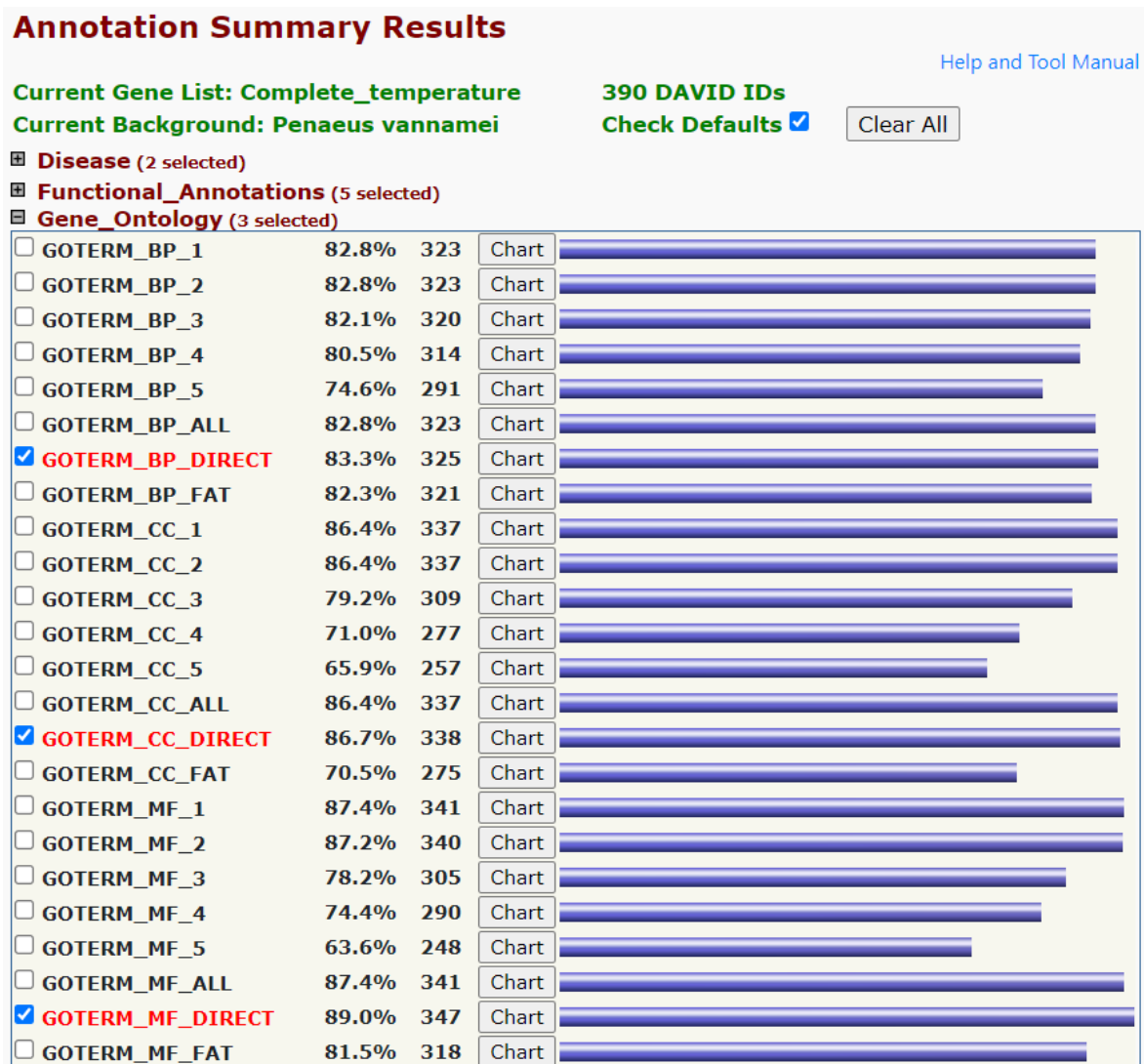
Anexo B. Selección del gen de referencia

Resultados de la herramienta RefFinder

RANKING ORDER (Better – Good – Average)			
Method	1	2	3
Delta CT	EF1a	RPL8	18S
BestKeeper	EF1a	18S	RPL8
Normfinder	EF1a	RPL8	18S
Genorm	RPL8/EF1a		18S
Recommended comprehensive ranking	EF1a	RPL8	18S



Anexo C. Porcentaje y términos de genes anotados por cada categoría ontológica durante el bioensayo de estrés térmico



Functional Annotation Chart

[Help and Manual](#)

Current Gene List: Up-regulated_temperature

Current Background: Homo sapiens

129 DAVID IDs

Options

3 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	endocytosis	RT		3	2,3	1,7E-2	1,0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	lipid metabolic process	RT		3	2,3	2,4E-2	1,0E0
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of necroptotic process	RT		2	1,6	2,6E-2	1,0E0

1 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	membrane	RT		12	9,3	1,7E-2	1,0E0

1 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	protein phosphatase inhibitor activity	RT		2	1,6	4,7E-2	1,0E0

Functional Annotation Chart

[Help and Manual](#)

Current Gene List: Down-regulated_temperature

Current Background: Penaeus vannamei

268 DAVID IDs

Options

5 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	translation	RT		6	2,2	1,6E-3	2,3E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	glycerol biosynthetic process	RT		2	0,7	1,3E-2	6,1E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	IRES-dependent viral translational initiation	RT		2	0,7	1,3E-2	6,1E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	proton transmembrane transport	RT		3	1,1	2,4E-2	7,3E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	mitochondrial translational elongation	RT		2	0,7	2,5E-2	7,3E-1

7 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrion	RT		15	5,6	1,6E-6	1,1E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrial large ribosomal subunit	RT		5	1,9	2,9E-5	1,0E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT		11	4,1	7,9E-3	1,8E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic translation initiation factor 2 complex	RT		2	0,7	2,0E-2	3,5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	multi-eIF complex	RT		2	0,7	2,5E-2	3,5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	ribosome	RT		4	1,5	3,9E-2	3,9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic translation initiation factor 2B complex	RT		2	0,7	4,0E-2	3,9E-1

4 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	heme binding	RT		8	3,0	2,4E-4	2,7E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	structural constituent of ribosome	RT		7	2,6	1,1E-3	6,1E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	NAD binding	RT		3	1,1	1,3E-2	5,0E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	glycerol-3-phosphatase activity	RT		2	0,7	2,6E-2	7,3E-1

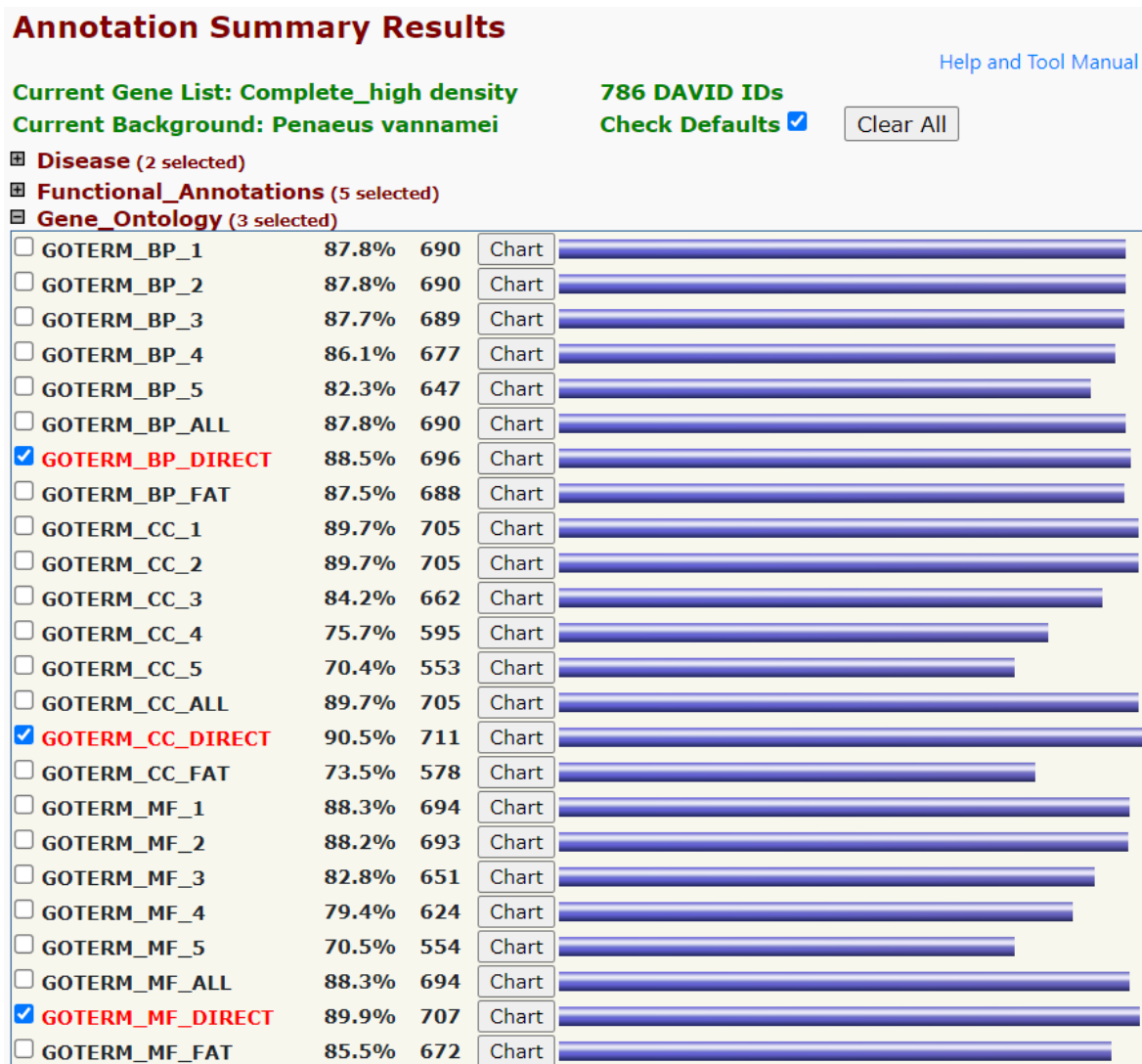
Rutas metabólicas enriquecidas de genes subexpresados por estrés térmico

2 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Arachidonic acid metabolism	RT		4	1,5	8,7E-3	5,2E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	RT		4	1,5	1,8E-2	5,3E-1

Anexo D. Porcentaje y términos de genes anotados por cada categoría ontológica durante el bioensayo de estrés por alta densidad de cultivo



Functional Annotation Chart

[Help and Manual](#)

Current Gene List: Up-regulated_high density

Current Background: Penaeus vannamei

486 DAVID IDs

Options

11 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	intracellular protein transport	RT		5	1,0	7,5E-3	3,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	brain morphogenesis	RT		2	0,4	1,2E-2	3,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	microtubule sliding	RT		2	0,4	1,2E-2	3,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	retrograde axonal transport	RT		2	0,4	1,2E-2	3,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	muscle cell cellular homeostasis	RT		2	0,4	1,7E-2	4,0E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	formaldehyde catabolic process	RT		2	0,4	2,3E-2	4,5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	germ cell development	RT		2	0,4	2,9E-2	4,6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	microtubule organizing center organization	RT		2	0,4	3,5E-2	4,6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	synaptic signaling	RT		2	0,4	4,0E-2	4,6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	vesicle transport along microtubule	RT		2	0,4	4,0E-2	4,6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	selenocysteine incorporation	RT		2	0,4	4,6E-2	4,8E-1

6 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	CURI complex	RT		2	0,4	1,4E-2	3,9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	UTP-C complex	RT		2	0,4	1,9E-2	3,9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cytoplasm	RT		19	3,9	2,4E-2	3,9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	dystrophin-associated glycoprotein complex	RT		2	0,4	3,2E-2	3,9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT		9	1,9	3,6E-2	3,9E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	endoplasmic reticulum membrane	RT		5	1,0	3,6E-2	3,9E-1

6 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	iron ion binding	RT		6	1,2	1,6E-3	1,6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	N-acetyltransferase activity	RT		4	0,8	2,8E-3	1,6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	S-formylglutathione hydrolase activity	RT		2	0,4	1,1E-2	4,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	cGMP-dependent protein kinase activity	RT		2	0,4	2,2E-2	6,5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	cGMP binding	RT		2	0,4	3,3E-2	6,5E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	dynein complex binding	RT		2	0,4	3,3E-2	6,5E-1

Rutas metabólicas enriquecidas de genes sobre-expresados por alta densidad

2 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	RT		17	3,5	2,4E-2	8,2E-1
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Ether lipid metabolism	RT		3	0,6	5,3E-2	9,0E-1

Functional Annotation Chart

[Help and Manual](#)

Current Gene List: Down-regulated_high density

Current Background: Penaeus vannamei

350 DAVID IDs

Options

10 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	translation	RT		11	3,1	2,3E-9	2,5E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	formation of cytoplasmic translation initiation complex	RT		4	1,1	1,2E-4	6,5E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	fatty acid transport	RT		3	0,9	6,0E-4	2,2E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	glycerol biosynthetic process	RT		2	0,6	1,1E-2	2,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	endonucleolytic cleavage to generate mature 3'-end of SSU-rRNA from (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	RT		2	0,6	1,1E-2	2,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	cytoplasmic translational initiation	RT		2	0,6	2,2E-2	3,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	formaldehyde catabolic process	RT		2	0,6	2,2E-2	3,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	superoxide metabolic process	RT		2	0,6	3,2E-2	4,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of translational initiation	RT		2	0,6	3,7E-2	4,6E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_BP_DIRECT	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rRNA from 5.8S rRNA and LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA)	RT		2	0,6	4,3E-2	4,7E-1

11 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	ribosome	RT		10	2,9	3,0E-8	1,6E-6
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic 48S preinitiation complex	RT		4	1,1	4,4E-5	6,5E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic 43S preinitiation complex	RT		4	1,1	4,4E-5	6,5E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cytosolic small ribosomal subunit	RT		5	1,4	4,9E-5	6,5E-4
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT		12	3,4	1,4E-3	1,4E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cytoplasm	RT		21	6,0	5,6E-3	4,9E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrion	RT		9	2,6	6,4E-3	4,9E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	rough endoplasmic reticulum	RT		2	0,6	9,4E-3	6,2E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrial large ribosomal subunit	RT		3	0,9	1,2E-2	6,9E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	eukaryotic translation initiation factor 3 complex, eIF3m	RT		2	0,6	3,2E-2	1,7E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_CC_DIRECT	cytosolic large ribosomal subunit	RT		3	0,9	4,1E-2	2,0E-1

12 chart records

[Download File](#)

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	structural constituent of ribosome	RT		12	3,4	2,3E-9	2,2E-7
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	translation initiation factor activity	RT		6	1,7	1,3E-4	6,0E-3
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	fatty acid binding	RT		3	0,9	1,7E-3	5,5E-2
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	RNA binding	RT		9	2,6	4,8E-3	1,1E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	metal ion binding	RT		13	3,7	6,9E-3	1,3E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	rRNA binding	RT		3	0,9	8,1E-3	1,3E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	S-formylglutathione hydrolase activity	RT		2	0,6	1,0E-2	1,4E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	4 iron, 4 sulfur cluster binding	RT		3	0,9	1,7E-2	2,0E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	glycerol-3-phosphatase activity	RT		2	0,6	2,1E-2	2,2E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	N-acetyltransferase activity	RT		3	0,9	2,8E-2	2,7E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	fatty acyl-CoA hydrolase activity	RT		2	0,6	3,6E-2	3,1E-1
<input type="checkbox"/>	GOTERM_MF_DIRECT	mRNA binding	RT		4	1,1	4,9E-2	3,9E-1

Rutas metabólicas enriquecidas de genes subexpresados por alta densidad

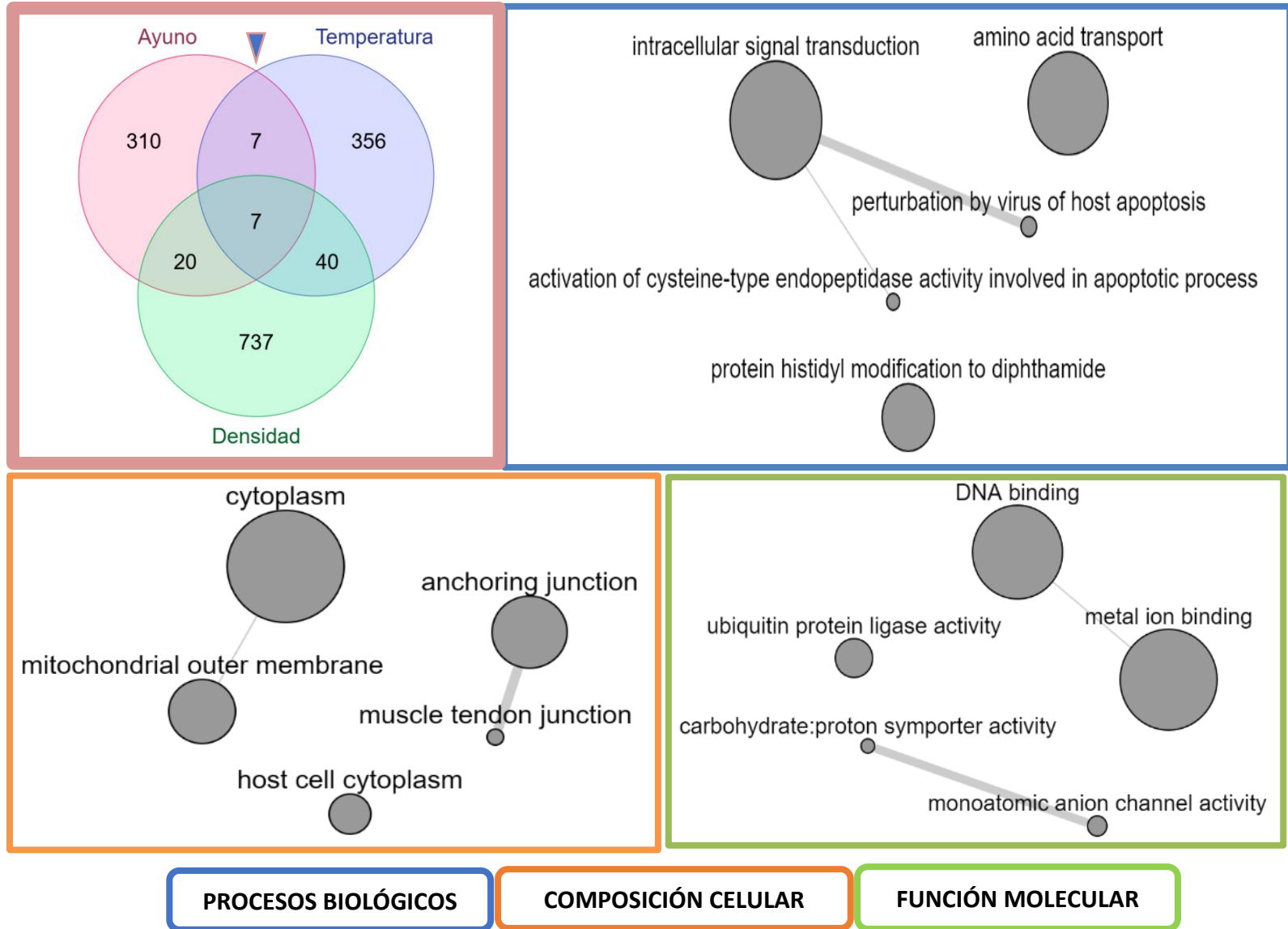
2 chart records

[Download File](#)

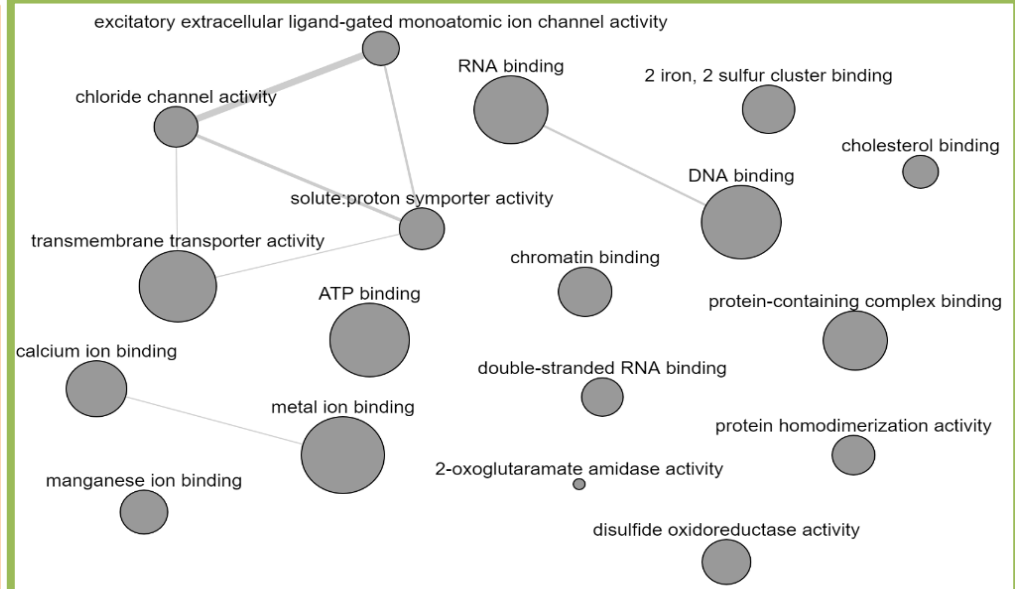
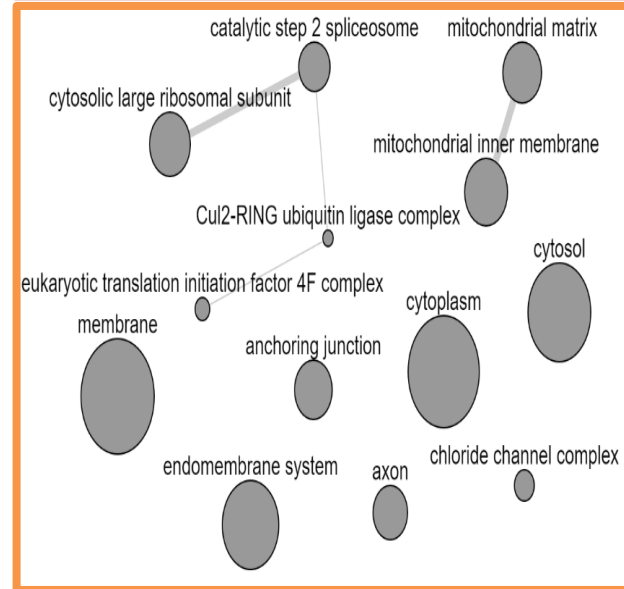
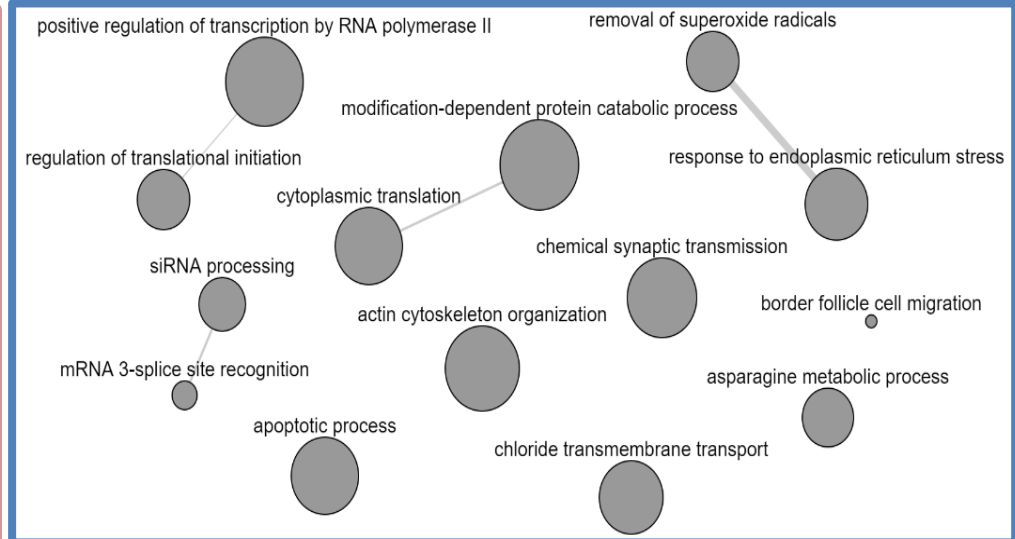
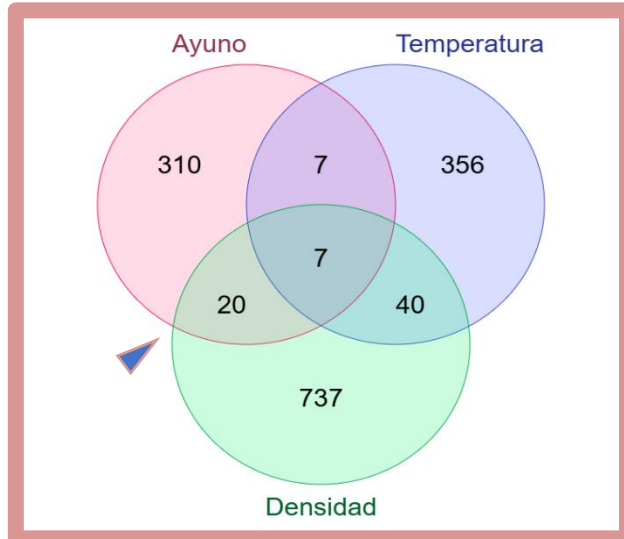
Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Ribosome	RT		10	2,9	9,6E-6	4,8E-4
<input type="checkbox"/>	KEGG_PATHWAY	Fatty acid degradation	RT		4	1,1	7,4E-3	1,8E-1

Anexo E. Términos de genes expresados diferencialmente durante el CC de *P. vannamei*

1. AYUNO vs TEMPERATURA



2. AYUNO vs DENSIDAD

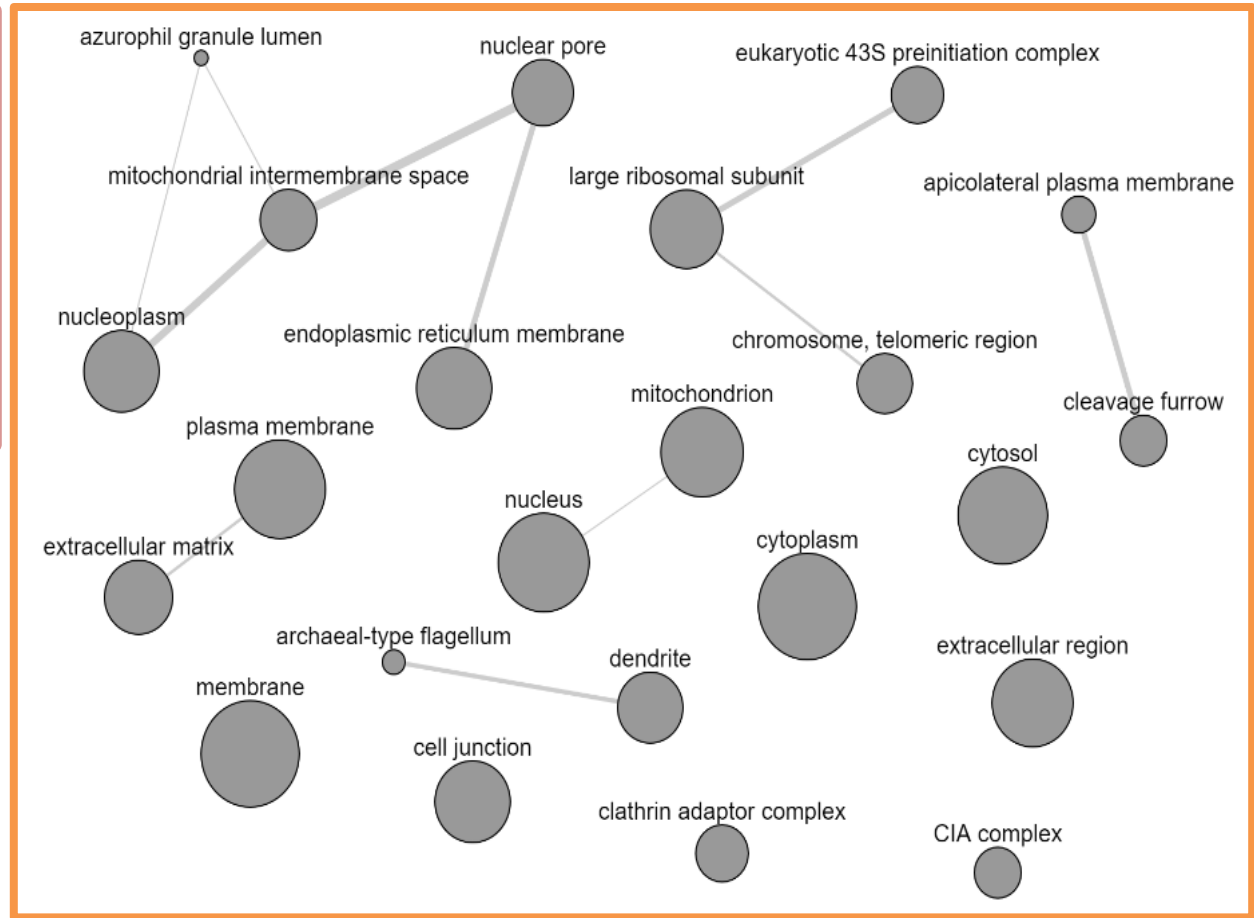
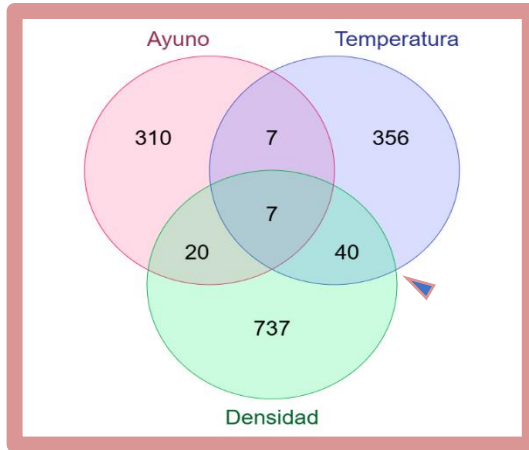


PROCESOS BIOLÓGICOS

COMPOSICIÓN CELULAR

FUNCIÓN MOLECULAR

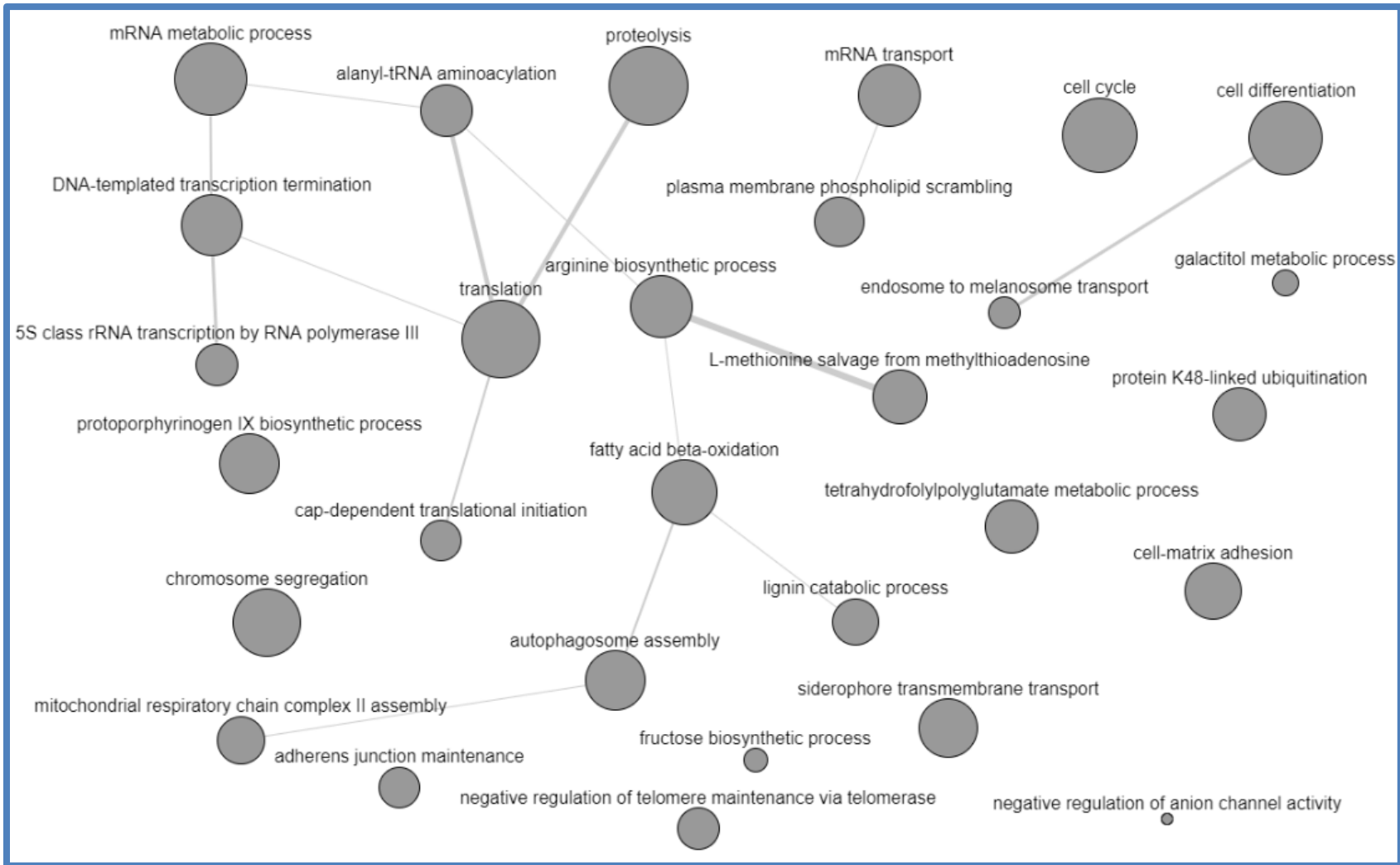
3. TEMPERATURA vs DENSIDAD



PROCESOS BIOLÓGICOS

COMPOSICIÓN CELULAR

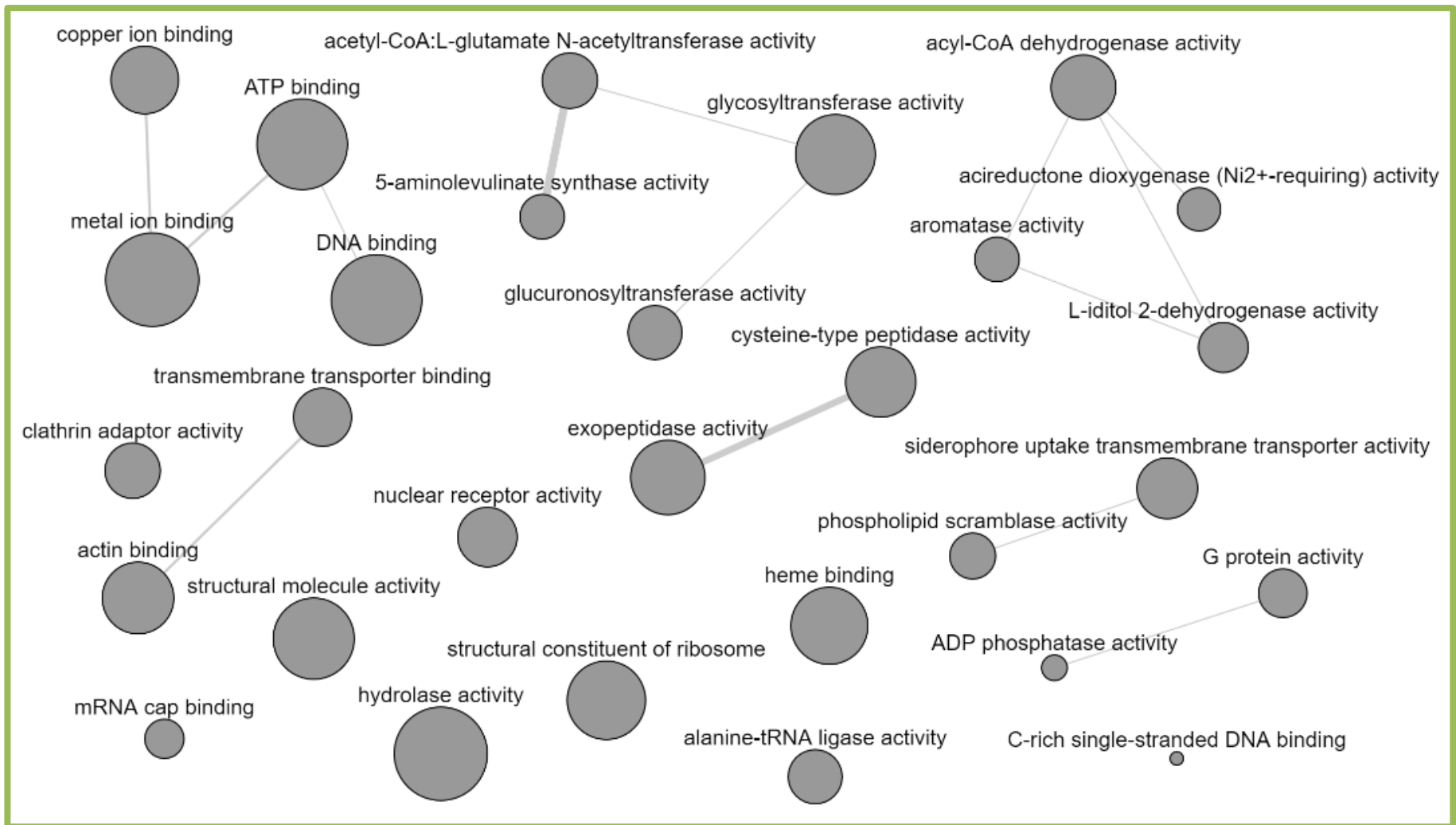
FUNCIÓN MOLECULAR



PROCESOS BIOLÓGICOS

COMPOSICIÓN CELULAR

FUNCIÓN MOLECULAR



PROCESOS BIOLÓGICOS

COMPOSICIÓN CELULAR

FUNCIÓN MOLECULAR