



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DEL ACEITE VEGETAL (CANOLA) Y ANIMAL
(SARDINA Y SALMÓN) EN EL ALIMENTO SOBRE LA
EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL CAMARÓN
BLANCO *Penaeus vannamei***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Susej Guadalupe López Marcos

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2020.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 14 del Mes de febrero del 2020, 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:

"Efecto del aceite vegetal (canola) y animal (sardina y salmón) en el alimento sobre la expresión transcripcional del camarón blanco *Penaeus vannamei*"

Presentada por el alumno:

Susej Guadalupe López Marcos

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

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

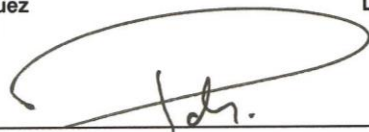
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dra. Cristia Escobedo Fregoso
Co-Directora de Tesis



Dra. Elena Palacios Mechetnov
Tutora



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Cátedras CONACYT-CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Co-Director de tesis

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Cátedras CONACYT-CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Co-Directora de tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov

CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Co-Tutora

Comité Revisor de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Jurado de Examen

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Suplente

Dr. Edouard Kraffe De Laubarede


CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Resumen

El cultivo de camarón se ha desarrollado de manera exponencial en todo el mundo, siendo su nutrición una de las áreas de investigación más importantes. Actualmente, es escasa la información sobre el efecto de la calidad de lípidos en la dieta sobre la expresión de genes del camarón blanco *Penaeus vannamei*. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del aceite vegetal y animal sobre la expresión transcripcional y el perfil de ácidos grasos (AG) de *P. vannamei*. Se realizó un ensayo de alimentación durante 28 días con tres alimentos experimentales utilizando diferentes aceites; 'canola', 'sardina', y una mezcla de aceite de 'sardina + salmón'. El peso final, la ganancia de peso y la tasa de crecimiento específico fueron significativamente mayores para los camarones alimentados con 'sardina + salmón' ($P < 0.05$). En cuanto al perfil de AG, tanto en la fracción polar como en la neutra, los niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) fueron mayores en 'sardina + salmón' y 'sardina' que en la dieta 'canola', donde para este último se observó una mayor proporción de ácidos α -linolénico (18:3n-3) y linoleico (18:2n-6), lo que reflejó la composición de los lípidos de la dieta.

A partir de un análisis de secuenciación masiva a nivel transcripcional entre los tratamientos evaluados y utilizando el genoma de referencia de *P. vannamei* ASM378908v1, se encontraron 216 genes expresados diferencialmente ($P < 0.05$) entre los tres tratamientos, los cuales se asocian a diferentes procesos biológicos como metabolismo de lípidos, funciones musculares, estrés y daño oxidativo. En los dos tratamientos en los que se utilizó aceite de pescado ('sardina' y 'sardina + salmón'), se identificaron 86 genes expresados diferencialmente respecto al tratamiento 'canola' ($P < 0.05$), considerados como potenciales marcadores de expresión asociados al crecimiento. Aunque se tuvo restricción de aceite de pescado en la dieta 'canola', no se observaron genes relacionados con la síntesis, elongación y de saturación de HUFA.

Palabras clave: camarón, ácidos grasos, nutrigenómica.



Vo.Bo. Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-director de tesis



Vo.Bo. Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-directora de tesis

Summary

Shrimp farming has developed exponentially worldwide, and nutrition is one of the most critical areas of research to continue this expansion. Currently, there is little information about the effect of dietary lipid quality on gene expression in the white shrimp *Penaeus vannamei*. The aim of this study was to determine the effect of vegetable and animal oil on the transcriptional expression and fatty acid (FA) profile of *P. vannamei*. A 28-day feeding trial was conducted with three experimental feeds using different oils; 'canola', 'sardine', and a 'sardine + salmon' oil mixture. The final weight, weight gain and specific growth rate were significantly higher for the shrimp fed 'sardine + salmon' ($P < 0.05$). Regarding the FA profile, both in the polar and neutral fractions, the levels of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were higher in 'sardine + salmon' and 'sardine' than in the 'canola' diet, where a higher proportion of α -linolenic (18:3n-3) and linoleic (18:2n-6) acids was observed for the latter, reflecting the lipid composition of the diet.

From a massive transcriptional sequencing analysis among the evaluated treatments and using the reference genome of *P. vannamei* ASM378908v1, 216 differentially expressed genes ($P < 0.05$) were found among the three treatments, which are associated with different biological processes such as lipid metabolism, muscle function, stress and oxidative damage. In the two treatments in which fish oil was used ('sardine' and 'sardine + salmon'), 86 differentially expressed genes were identified with respect to 'canola' treatment ($P < 0.05$), considering these genes as potential expression markers associated with growth. Although fish oil was restricted in the 'canola' diet, no genes related to HUFA synthesis, elongation and saturation were observed.

Keywords: *white shrimp, fatty acids, nutrigenomic*



Vo.Bo. Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-director de tesis



Vo.Bo. Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-directora de tesis

Dedicatoria

A Celia

Gracias por el tiempo que estuviste conmigo, por tus consejos y tu gran amor. Siempre te recordaremos.

A mis padres

Por su cariño, sacrificio y por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes, incluido este.

A mis hermanas

Por ser las principales promotoras de mis sueños, por su constante e incondicional apoyo.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), como institución receptora de mis estudios de posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada no. 634176.

Al proyecto #2015-01-887 perteneciente a la Convocatoria para Atender Problemas Nacionales 2015 financiado por CONACYT, cuyo responsable técnico es el Dr. Alberto Peña Rodríguez.

A las instalaciones y laboratorios del CIBNOR proporcionados para el desarrollo del presente trabajo y a su personal responsable:

- Laboratorio de Nutrición Acuícola y Planta de Alimentos, Dr. Ernesto Goytortúa.
- Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola, Biol. Sandra de La Paz Reyes.
- Laboratorio de Metabolismo de lípidos, M.C. Olivia Arjona López
- Laboratorio de Genómica y Bioinformática, M.C. Gabriela Mendoza Carrión.
- Laboratorio de Análisis Químico Proximal, Geol. Sindi Juan Antúnez e IBQ. María Dolores Rondero Astorga, a quien además le agradezco su amabilidad y cariño durante mi estancia en CIBNOR.

Al personal administrativo de posgrado por sus atenciones: Dra. Gracia Gómez Anduro, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera, y de manera particular a C. Tania Núñez Valdez por siempre resolver mis dudas de la manera más atenta y al Lic. Horacio Gómez Sandoval por todo su apoyo en soporte técnico.

A la Dra. Cristina Escobedo Fregoso y a la Dra. Elena Palacios Mechetnov por formar parte de mi comité tutorial, por su apoyo, consejos y opiniones que ayudaron en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Alberto Peña Rodríguez por brindarme la oportunidad y la confianza de trabajar en su proyecto, así como por el apoyo, motivación y enseñanzas durante mi formación académica.

Al programa Erasmus + Mobilité Internationale de Crédits (MIC) por la beca de movilidad otorgada durante mi estancia académica. De igual manera a la Plataforma Analítica LIPIDOCEAN del Institut Universitaire Européen de la Mer y al técnico responsable Dr. Antoine Bideau, por permitirme aprender y trabajar en el laboratorio.

Al Dr. Edouard Kraffe De Laubarede, y a la Université de Bretagne Occidentale (UBO) por su apoyo y colaboración durante mi estancia en Brest, Francia.

Al M.C. Roberto Arredondo por apoyarme amablemente con los análisis bioinformáticos.

A mis compañeros y amigos de maestría, gracias por sus consejos y por esos momentos de distracción cuando más lo necesitaba, de manera particular a Nadia, porque además de ayudarme académicamente se ha convertido en mi gran amiga.

A mi familia por su cariño y su incondicional apoyo en cada etapa de mi vida; especialmente a mis hermanos que a distancia siempre me envían sus buenas vibras, a mis padres Eloina y Jesús, a mis hermanas Dulce, Bris, Aby, y a mis sobrinos Ian, Lulú y Evan, sin ustedes este logro no hubiese sido posible.

A mis grandes amigos Paty, Luis, Bianca y Miguel; por su amistad a pesar de la distancia, por creer en mis capacidades, por su confianza y por su motivación desde siempre.

Un agradecimiento especial a Argel, por su apoyo incondicional en todo momento, por su cariño y por su constante motivación cada día.

Muchas gracias a todos.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Abreviaturas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades de <i>Penaeus vannamei</i>	3
2.2 Nutrición del camarón.....	4
2.2.1 Los ácidos grasos en la dieta.....	8
2.2.2 Metabolismo de ácidos grasos en camarón.....	12
2.3 Uso de aceites vegetales en dietas para camarón.....	15
2.4 Efecto del alimento sobre la expresión de genes de camarón.....	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos particulares.....	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Formulación y elaboración de alimentos experimentales.....	24
6.2 Análisis químico proximal.....	26
6.2.1 Determinación de humedad.....	26
6.2.4 Determinación de lípidos.....	27
6.3 Ensayo <i>in vivo</i> de alimentación.....	29
6.5 Parámetros zootécnicos considerados.....	30

6.6 Análisis de lípidos y del perfil de ácidos grasos	31
6.6.1 Extracción de lípidos.....	31
6.6.2 Lípidos totales de músculo de camarón	31
6.6.3 Obtención de lípidos polares y neutros de músculo	32
6.7 Análisis estadístico	33
6.8 Análisis de expresión diferencial.....	34
6.8.1 Extracción de ARN	34
6.8.2 Análisis bioinformático	34
7. RESULTADOS	37
7.1. Análisis químico proximal de alimentos	37
7.2 Supervivencia y rendimiento productivo	37
7.3 Lípidos totales en músculo de camarón.....	40
7.4 Perfil de ácidos grasos.....	40
7.4.1 Dietas experimentales	40
7.4.2 Fracciones polares y neutras de músculo	43
7.5 Análisis transcripcional	48
7.5.1 Limpieza de lecturas.....	48
7.5.2 Alineamiento y ensamble del transcriptoma	48
7.6 Análisis de expresión diferencial.....	49
7.6.1 Análisis de componentes principales.....	49
7.6.2 Expresión diferencial entre camarones alimentados con aceite vegetal y aceite de pescado	52
8. DISCUSIÓN	57
8.1 Rendimiento productivo de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas.....	57
8.2 Composición de ácidos grasos de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas	58
8.3 Expresión diferencial en <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas.....	60

9. CONCLUSIONES	65
10. RECOMENDACIONES	65
11. LITERATURA CITADA	66
12. ANEXO	79

Lista de figuras

Figura 1. Características morfológicas de <i>Penaeus vannamei</i> , Boone, 1931. (Tomado de Fischer <i>et al.</i> , 1955).	4
Figura 2. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados (Chen <i>et al.</i> , 2015a).....	14
Figura 3. Protocolo de HISAT2 para realización de análisis bioinformático.	35
Figura 4. Peso Final.	38
Figura 5. Tasa de crecimiento	38
Figura 6. Tasa de crecimiento específico	39
Figura 7. Consumo de alimento	39
Figura 8. Factor de conversión alimenticia	39
Figura 9. Calidad de las lecturas de las librerías de los camarones del tratamiento 'Sardina'. Forward (A), reverse (B). Eje Y: valor de Q; Eje X: posición de los nucleótidos en pares de bases.....	48
Figura 10. Análisis de componentes principales de la expresión génica de camarones por tratamiento y sus réplicas.....	50
Figura 11. Clasificación de genes expresados diferencialmente en los camarones del tratamiento 'canola' respecto a los tratamientos 'sardina', 'sardina + salmón', por su función biológica.	52
Figura 12. Distribución de FPKM (fragments per kilobase million) de genes expresados diferencialmente en los camarones alimentados con los diferentes tratamientos.	56

Lista de tablas

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>P. vannamei</i>	3
Tabla II. Clasificación general actual de los sistemas de producción de cultivo de camarón.....	5
Tabla III. Requerimientos de nutrientes recomendados para <i>P. vannamei</i> . Concentraciones óptimas con respecto al total de la dieta.	6
Tabla IV Clasificación de algunos ácidos grasos de acuerdo al nivel de saturación (nombre trivial)	10
Tabla V. Estudios realizados para sustituir aceite de pescado por aceite vegetal en camarones juveniles <i>P. vannamei</i>	18
Tabla VI. Formulación de alimentos experimentales (g kg ⁻¹)	25
Tabla VII. Resultados obtenidos del análisis químico proximal a los alimentos utilizados durante el ensayo de alimentación (base seca).	37
Tabla VIII. Supervivencia de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes de lípidos.....	38
Tabla IX. Porcentaje de lípidos totales del músculo de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas	40
Tabla X. Concentración de ácidos grasos (µg mg ⁻¹ de alimento, base húmeda) en dietas experimentales	41
Tabla XI. Composición relativa de ácidos grasos (%) en dietas experimentales..	42
Tabla XII. Concentración de ácidos grasos (µg mg ⁻¹ músculo, base húmeda) en la fracción lipídica polar de músculo de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas	44
Tabla XIII. Concentración de ácidos grasos (µg mg ⁻¹ músculo, base húmeda) de la fracción lipídica neutra de músculo de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas	45
Tabla XIV. Composición relativa de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de la fracción lipídica polar de músculo de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas	46
Tabla XV. Composición relativa de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de la fracción lipídica neutra de músculo de <i>P. vannamei</i> alimentado con diferentes fuentes lipídicas	47

Tabla XVI. Estadística del mapeo de las lecturas en el conjunto de datos completo	49
Tabla XVII. Genes expresados diferencialmente entre los tres tratamientos y potencialmente relacionados con el metabolismo de lípidos, funciones musculares y estrés o daño oxidativo.	51
Tabla XVIII. Genes sobre-expresados diferencialmente en los tratamientos 'canola' respecto a los tratamientos con aceite de pescado.	54
Tabla XIX. Genes sub-expresados diferencialmente en los tratamientos 'canola', respecto a los tratamientos con aceite de pescado	55

Abreviaturas

µg	Microgramos	ha	Hectáreas
AG	Ácidos grasos		Ácidos grasos
ALA	Ácido α-linolénico	HUFA	altamente insaturados
ANOVA	Análisis de varianza		
ARA	Ácido araquidónico	INAPESCA	Instituto Nacional de Pesca
ARN	Ácido ribonucleico	LA	Ácido linoléico
ARNm	ARN mensajero	LC	Cadena larga
ATP	Adenosin trifosfato	m	Metros
cm	Centímetros	mg L ⁻¹	Miligramo por litro
CoA	Coezima A	ml	Mililitros
CONAPESCA	Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca	MUFA	Ácidos grasos mono-insaturados
DE	Desviación estándar	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
DHA	Ácido docosaheptaenoico	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
EFA	Ácido graso esencial		
EPA	Ácido eicosapentaenoico	NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
FAME	Ácidos grasos metil esterificados	pb	Pares de bases
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura	pH	Potencial de hidrógeno
FPKM	Fragmentos de transcrito por kilobase por millón de lecturas mapeadas	PUFA	Ácidos grasos poliinsaturado
g	Gramos	SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
g kg ⁻¹	Gramos por kilogramo	SFA	Ácidos grasos saturados
h	Horas	ups	Unidades prácticas de salinidad
		UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

Globalmente, la acuicultura es una industria que se ha convertido en el sector de producción de alimentos con mayor viabilidad económica, apoyándose en técnicas y procesos sobre los cuales se cultivan organismos acuáticos en condiciones controladas, y que gracias a capacitaciones, el uso de laboratorios y otras herramientas, han permitido que los niveles de producción aumenten de manera exponencial en comparación con la pesca tradicional (CONAPESCA, 2018).

En los últimos años, el cultivo de camarón ha mostrado un desarrollado acelerado en todo el mundo, expandiéndose más que cualquier otro sector productivo pecuario. De acuerdo con el estado mundial de la pesca y la acuicultura, el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) es una de las principales especies producidas en la acuicultura mundial (FAO, 2018).

P. vannamei es el principal crustáceo de pesca y acuicultura en México (INAPESCA, 2018) debido al gran número de ventajas competitivas que presenta como: tasa elevada de crecimiento desde 1.5 g por semana hasta alcanzar un peso promedio de 20 g bajo condiciones de cultivo intensivo, resistencia ante infecciones como el síndrome del Taura (TVS), gran tolerancia a factores ambientales como salinidad entre 0.5–5 ups, crecer en densidades de siembra por encima de 50 org/m², facilidad de aclimatación, tolerancia a temperaturas por debajo de los 15°C y por encima de los 33°C, requerimientos proteicos relativamente bajos (20–35%), características particulares que lo convierten en una especie particular para el cultivo (Wyban y Sweeny, 1991; Collins *et al.*, 2005; FAO, 2009; Godínez *et al.*, 2011).

En México existen alrededor de 1,447 granjas camaronícolas dedicadas a la producción, comercialización y distribución de este valioso alimento. El organismo de la SADER destaca que el país se posiciona en séptimo lugar como productor mundial de camarón, con un promedio anual de 221 mil 695 toneladas de producto, de las cuales el 56.8 por ciento lo genera la acuicultura (CONAPESCA, 2018). La industria del cultivo de este crustáceo es una de las que mayores divisas

generan al país por su exportación. En consecuencia, representa el cultivo de mayor valor económico para México.

Dentro del cultivo de camarón, actualmente existen líneas de investigación de gran interés orientadas a estudios de genética, sanidad, reproducción, comercialización, ecología, tecnología de alimentos y nutrición. La nutrición es considerada como una de las áreas de estudio de gran importancia debido a que el alimento constituye la fracción más significativa dentro de los costos de operación en el cultivo de organismos acuáticos a nivel semi-intensivo o intensivo, llegando a representar hasta un 60% del costo total de la producción (FAO, 1989; Tacon, 1989; Arzola *et al.*, 2008; INAPESCA, 2018).

Diferentes estudios nutricionales (Lim *et al.*, 1997; González-Félix *et al.*, 2002ab; 2003; Zhou *et al.*, 2007) se han centrado en la inclusión de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) como el EPA (20:5n-3) y DHA (22:6n-3), utilizando el aceite de pescado como principal fuente de estos en dietas para camarón blanco debido a mejoras observadas en el rendimiento productivo como supervivencia y crecimiento. En crustáceos estos HUFA son considerados esenciales debido a que su síntesis *de novo* es nula o muy limitada, puesto que el grado en que los animales pueden producir HUFA a partir de otros ácidos grasos polinsaturados (PUFA) de 18 carbonos depende de la capacidad de desaturación y elongación (Tocher, 2003).

En el presente estudio se evaluó el efecto de un aceite de origen vegetal (canola) y dos de animal (sardina y salmón) en la dieta, sobre el rendimiento productivo, el perfil de ácidos grasos y la expresión de genes del camarón blanco *P. vannamei*.

2. ANTECEDENTES

El cultivo del camarón se inició a gran escala en diversos países del mundo a partir de los años ochenta, y desde entonces se ha buscado controlar la calidad durante todo el proceso de producción y de obtener un producto final similar al camarón silvestre. La camaronicultura se realiza a través de sistemas de explotación en condiciones controladas, con la tecnología adecuada y adaptada para obtener los mejores rendimientos en términos de crecimiento, con la máxima sobrevivencia posible.

2.1 Generalidades de *Penaeus vannamei*

Los camarones taxonómicamente (Tabla I) se ubican en el Phylum Artrópoda por poseer patas articuladas, dentro de la clase crustácea debido a que cuentan con un caparazón externo o exoesqueleto, y pertenecen al orden Decápoda porque tienen cinco pares de patas caminadoras.

Tabla I. Clasificación taxonómica de *P. vannamei*¹

Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Clase	Crustácea
Orden	Decápoda
Familia	Penaeidae
Género	<i>Penaeus</i>
Especie	<i>Penaeus vannamei</i>

¹ Modificado de Fischer *et al.*, 1995; FAO, 2019

Penaeus vannamei es un camarón perteneciente a la familia Penaeidae. Sus características distintivas son: rostro moderadamente largo, con dientes dorsales (8 o 9) y ventrales (1 o 2), surco y carina adrostrales cortos, terminándose al nivel o un poco por detrás del nivel del diente epigástrico. Las características familiares incluyen quelas móviles (garras) en los primeros tres pares de patas para caminar

y un tercer segmento torácico que nunca se superpone con el segundo. La coloración del organismo es normalmente blanca translúcida, pero esta puede cambiar dependiendo del sustrato, la alimentación y la turbidez del agua (FAO, 2018). La talla máxima es de 23 cm de longitud total. Esta especie presenta un rango de distribución desde la costa oriental del Océano Pacífico (Sonora, México) hasta Perú (Fischer *et al.*, 1955; INAPESCA, 2018).

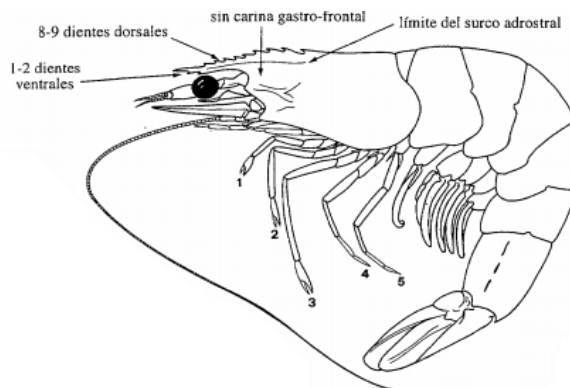


Figura 1. Características morfológicas de *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. (Tomado de Fischer *et al.*, 1955).

2.2 Nutrición del camarón

En la acuicultura, la alimentación tiene un papel fundamental en el crecimiento y supervivencia de los organismos (Canseco *et al.*, 2015), siendo la nutrición acuícola de camarón una de las áreas de investigación más importantes, ya que el alimento puede constituir una de las fracciones más significativas dentro de los costos totales de producción, por lo que se busca el desarrollo de alimentos “artificiales” balanceados de alta calidad nutricional y de alta digestibilidad que mantengan la estabilidad y salud de los ecosistemas acuáticos (INAPESCA, 2018).

Las técnicas para el crecimiento de camarones se han desarrollado dependiendo de la densidad de siembra y de la tecnificación utilizada (aireación, porcentaje de recambio de agua), del tipo de alimento y de las estrategias de alimentación,

clasificándose en cuatro categorías: extensivas, semi-intensivas, intensivas y súper-intensivas (Tabla II).

En las granjas de producción semi-intensiva e intensiva, los camarones dependen principalmente de las dietas artificiales como fuente de nutrientes, que son suministradas de 2–5 veces diariamente, por lo que se requiere la mejor calidad de alimento posible (Shiau, 1998; FAO, 2009).

Tabla II. Clasificación general actual de los sistemas de producción de cultivo de camarón.¹

Tipo de cultivo	Tamaño del estanque	Densidad de siembra	Recambio de agua	Alimentación	Rendimiento de producción
Extensivo	>100 ha	5 < org/m ²	Bajo o nulo	Poca o nula alimentación suplementaria	<50 kg ha ⁻¹
Semi-intensivo	1 – 20 ha	11 – 25 org/m ²	5 – 20% diario	Es necesaria alimentación suplementaria	1,000 – 5,000 kg ha ⁻¹
Intensivo	0.1 – 2 ha	40 – 140 org/m ²	20 – 100% diario	Alimentación suplementaria	5,000 – 15,000 kg ha ⁻¹
Súper-intensivo	< 1 ha	< 200 org/m ²	Bajo o nulo	Nula alimentación suplementaria	80 ton ha ⁻¹

¹ Modificado de Hernández-Gurrola, 2016; Martínez-Córdova *et al.*, 2014.

Es importante que en la formulación de estos alimentos, se consideren ingredientes de alta digestibilidad así como el uso de atractantes para que el alimento sea consumido y digerido en el menor tiempo posible, minimizando la pérdida de nutrientes por lixiviación, disolución o degradación bacteriana (Molina y Villareal, 2008). La utilización de energía y nutrientes de cada dieta dependerá tanto del nivel de aporte como de la composición de la dieta.

En nutrición acuícola, se consideran como factores o promotores de crecimiento aquellas sustancias agregadas a la dieta en pequeñas cantidades que promuevan un crecimiento acelerado, reflejado en el aumento de talla y de peso corporal. Estas sustancias deben mantener su integridad durante el proceso de digestión y lograr ser absorbidas de forma eficaz para ser efectivas y ejercer su función en los tejidos musculares (Carrillo *et al.*, 2000).

El avance en el conocimiento de los requerimientos nutricionales de camarones peneidos ha permitido la formulación de dietas específicas para cada etapa del desarrollo de cada especie de interés comercial producida (Shiau, 1998). Se pueden utilizar diferentes ingredientes como fuente de nutrientes en la elaboración de las dietas, sin embargo existen ciertos nutrimentos que son requeridos por todos los organismos en crecimiento, y son conocidos como nutrientes esenciales o indispensables.

Tabla III. Requerimientos de nutrientes recomendados para *P. vannamei*. Concentraciones óptimas con respecto al total de la dieta.¹

Nutriente	Requerimiento recomendado para <i>P. vannamei</i>
Carbohidratos	30–40%
Proteína	35–40 %
Lisina	4.5%
Lípidos	5–10%
Fosfoglicéridos	0.5–1%
Colesterol	0.5–2%
Fosfolípidos	3–5%
PUFA/HUFA	1–3%
Vitaminas y Minerales	
Vitamina C	191 mg kg ⁻¹
Vitamina A	1.44 mg kg ⁻¹
Vitamina E	99 mg kg ⁻¹
Piridoxina	80–100 mg kg ⁻¹
Fósforo	0.7–2 g 100 g ⁻¹

¹ Tomado de Martínez-Córdova *et al.*, 2014.

Los requerimientos nutricionales en la dieta (Tabla III) se pueden clasificar bajo cinco diferentes grupos de nutrientes; carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales (Tacon, 1989; Molina y Villareal, 2008).

Los carbohidratos son considerados una fuente de energía barata en las dietas de camarón. Actualmente se utilizan diferentes cereales ricos en almidones y fibras como el trigo y maíz, sin embargo, estos carbohidratos pueden ser derivados de varios ingredientes, y son almacenados y liberados a través de varios procesos metabólicos. En cambio, para el caso de la proteína y lípidos, los requerimientos se consideran a nivel específico de aminoácidos y ácidos grasos respectivamente.

La proteína constituye del 65 al 70% del peso seco de un camarón, y es un componente importante del músculo (Van Wyk *et al.*, 1999). Los aminoácidos considerados esenciales para el crecimiento, como la metionina, arginina y lisina, son aportados principalmente por la harina de pescado, pudiendo ser reemplazados por otras fuentes proteicas más baratas como la harina de soya (Samocha *et al.*, 2004; Amaya *et al.*, 2007). El nivel de proteína en la dieta para *P. vannamei* puede variar de entre 25 y 50% dependiendo del sistema de cultivo, así como de la edad y tamaño de los organismos. Para los camarones de cultivo semi-intensivo el nivel de proteína en la dieta es de entre 35 y 40%.

Los lípidos son una fuente importante de energía metabólica (ATP) con valor energético global de 9.5 Kcal g⁻¹, superior a las proteínas (5.6 Kcal g⁻¹) y los carbohidratos (4.1 Kcal g⁻¹) (Tacon, 1989). Muchos ácidos grasos del metabolismo de los lípidos son esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de los animales acuáticos, por lo que se han determinado requerimientos esenciales de ácidos grasos en las dietas de crustáceos como el camarón.

El grupo de compuestos orgánicos llamados lípidos, incluyen ácidos grasos libres, fosfolípidos, triglicéridos, aceites, ceras y esteroides funcionan como una fuente importante de energía para el camarón. Debido a la importancia que representan para la nutrición, se ha descrito que los camarones deben cumplir requerimientos específicos para cada tipo de lípidos. Por ejemplo, los fosfolípidos son un tipo de

lípidos anfipáticos que están compuestos por una molécula de glicerol a la que se unen dos ácidos grasos en las posiciones n-1 y n-2, y por una molécula de ácido ortofosfórico que se une a la posición n-3. Los grupos fosfatos se unen a diferentes tipos de moléculas, pero cuando corresponde a colina, se forma la fosfatidilcolina o lecitina (Torres y Duran, 2015). La lecitina, es uno de los componentes importantes de las membranas celulares y desempeñan un papel importante en el metabolismo de los lípidos (Van Wyk *et al.*, 1999). Gong *et al.* (2001) recomiendan un nivel de suplementación de fosfolípidos de 3 a 5% de dieta.

Otro tipo de lípidos considerados de gran importancia para los peneidos son los esteroides, los cuales se requieren del 0.5–1% de la dieta. Los esteroides funcionan como precursores para la maduración y la muda, siendo considerado el colesterol como un componente esencial en el crecimiento y supervivencia debido a la incapacidad del camarón para sintetizar esteroides *de novo* (Shiau, 1998; Kanazawa, 2001).

Las vitaminas son compuestos orgánicos que se requieren en la dieta en cantidades relativamente pequeñas para lograr el crecimiento y desarrollo normal. Por su parte, los minerales son compuestos inorgánicos requeridos en diferentes procesos metabólicos, que en grandes proporciones son llamados minerales mayores, mientras que en cantidades diminutas son llamados minerales traza, y generalmente son agregados a la dieta en una premezcla mineral. Algunas veces las vitaminas y los minerales se combinan en una sola premezcla.

2.2.1 Los ácidos grasos en la dieta

Los lípidos son una fuente concentrada de energía que provee componentes dietéticos esenciales que incluyen ácidos grasos esenciales, fosfolípidos, colesterol y vitaminas (Deering *et al.*, 1997).

Los ácidos grasos están conformados por una cadena hidrocarbonada lineal (R) de diferente número de átomos de carbono con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo y con tres enlaces libres ocupados por hidrógeno (H₃C-) en el otro extremo. Los ácidos grasos difieren en la longitud de la cadena y en el grado de saturación (número de dobles enlaces y átomos de hidrógeno) (Shiau, 1998).

Una de las clasificaciones de los ácidos grasos es con base en el nivel de saturación que presenta su cadena carbonada (Tabla IV); distinguiéndose principalmente los ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) los cuales presentan un doble enlace en su cadena hidrocarbonada, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con dos o más insaturaciones y los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) definidos como ácidos grasos con ≥ 20 carbonos y ≥ 3 dobles enlaces (Ju *et al.*, 2012; Nolasco-Alzaga, 2016; Bell y Tocher, 2009).

Algunas de las fuentes de lípidos usadas en las dietas para camarón con contenido en ácidos grasos linoleicos y linolenicos son: el aceite de pescado, el aceite de hígado de bacalao y aceite de calamar, que son aceites con alto contenido en ácido eicosapentaenoico (EPA) y en ácido docosahexaenoico (DHA); y como fuente de fosfolípidos la lecitina de soya.

Es importante considerar el aporte de lípidos de los otros ingredientes de la formulación, que generalmente disminuye la adición de fuentes puras de lípidos al 34% de la dieta seca (Suárez, 1996).

El papel de los ácidos grasos en la fisiología de cualquier organismo es variado. Los SFA se utilizan principalmente como fuente de reserva de energía a diferencia de los PUFA, que tienen un impacto en la fluidez de la membrana celular y en la producción de eicosanoides, una clase de bioquímicos asociados con una amplia gama de procesos fisiológicos (Brett y Müller, 1997).

Tabla IV. Clasificación de algunos ácidos grasos de acuerdo al nivel de saturación (nombre trivial)³

SFA	MUFA	PUFA	HUFA
12:0 Ácido láurico	14:1n-5 Ácido miristoleico	16:2n-4 Ácido hexadecadienoico	20:4n-3 ¹ Ácido eicosatetraenoico
13:0 Ácido tridecanoico	16:1n-7 Ácido palmitoleico	16:3n-4 Ácido hexadecatrienoico	20:4n-6 ² Ácido araquidónico (ARA)
14:0 Ácido mirístico	16:1n-9	16:4n-3 ¹	20:5n-3 ¹ Ácido eicosapentaenoico (EPA)
15:0 Ácido pentadecanoico	16:1n-10 Ácido sapiénico	18:2n-6 ² Ácido linoleico (LA)	21:5n-3 ¹
16:0 Ácido palmítico	18:1n-9 Ácido oleico	18:2n-4	22:5n-3 ¹ Ácido docosapentaenoico
17:0 Ácido margárico	18:1n-7 Ácido vaccénico	18:3n-3 ¹ Ácido α -linolénico (ALA)	22:6n-3 ¹ Ácido docosahexaenoico (DHA)
18:0 Ácido esteárico	20:1n-9 Ácido eicosenoico	18:3n-6 ² Ácido γ -Linolénico (GLA)	
19:0 Ácido nonadecanoico	22:1n-9 Ácido erúcico	18:4n-3 ¹ Ácido estearidónico	
20:0 Ácido araquírico	24:1n-9 Ácido nervónico		
21:0 Ácido heneicosanoico			
22:0 Ácido behéico			
24:0 Ácido lignocérico			

Ácidos grasos omega-3¹. Ácidos grasos omega-6². Modificado de Ju *et al.*, 2012; Nolasco Alzaga, 2016³.

Se tiene conocimiento a través de diferentes estudios de que los ácidos grasos de las series n-6 linoleico (LA) y de las series n-3 α -linolénico (ALA) son importantes en la dieta para especies de camarón como *Penaeus aztecus* (Shewbart y Mies, 1973), *Penaeus chinensis* (Xu *et al.*, 1993), *Penaeus japonicus* (Kanazawa *et al.*, 1979a; Kontara *et al.*, 1997) *Penaeus monodon* (Merican y Shim, 1996; Deering *et al.*, 1997, Glencross y Smith, 1999), *Penaeus merguensis* (Kanazawa *et al.*, 1979b), *Penaeus setiferus* (Bottino *et al.*, 1980), *Penaeus indicus* (Read, 1981), *Palaemon serratus* (Martin, 1980) y *P. vannamei* (Lim *et al.*, 1997; González-Félix *et al.*, 2002b; 2003; Zhou *et al.*, 2007).

Los PUFA y HUFA, son ampliamente responsables de un papel generalizado en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y de representar la principal fuente de combustible aeróbico para el metabolismo energético del músculo del camarón. El contenido de HUFA de las dietas artificiales y naturales afecta la supervivencia, el crecimiento, la conversión alimenticia, la fecundidad, la incubación del huevo, la muda y la tolerancia al estrés osmótico de crustáceos del género *Peneus*, debido a que los HUFA funcionan como precursores para los eicosanoides, un importante grupo de hormonas paracrinas responsables de una amplia gama de actividades fisiológicas (Kanazawa *et al.*, 1979; Kayama *et al.*, 1980, FAO, 1989; Brett y Müller, 1997).

La composición de ácidos grasos del camarón generalmente refleja los lípidos de la dieta, especialmente para las dietas que contienen ácidos grasos insaturados (Deering *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1997; González-Félix *et al.*, 2002a; 2002b; 2003; Ju *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). Los lípidos son necesarios en las dietas para camarón, no solo por su valor energético, sino también como fuente de ácidos grasos esenciales, esteroides, fosfolípidos y vitaminas solubles en grasa. El nivel óptimo de lípidos totales en la dieta para camarones peneidos varía desde 6–10%.

Se ha sugerido el uso de HUFA en las dietas de camarón para mejorar su calidad en aspectos como resistencia al estrés, mayor rendimiento productivo e incluso mortalidad. HUFA como DHA, EPA y el ARA, son ampliamente estudiados para

determinar los niveles óptimos de requerimientos nutricionales en las diferentes etapas de los organismos cultivados. Se ha demostrado que estos ácidos grasos esenciales se requieren en las dietas de los crustáceos a niveles entre 0.5 y 1% (Lim y Akiyama, 1995).

Actualmente, la proporción de ácidos grasos n-3 y n-6 debe ser un parámetro importante en la dieta para camarón (FAO, 2013), pese a que los ácidos grasos n-3 promueven un crecimiento más rápido que n-6 (Lim *et al.*, 1997). Se recomienda la inclusión de una combinación EPA y DHA a un nivel óptimo de 1% de la dieta para juveniles de *M. japonicus* (Kanazawa *et al.*, 1979) y para juveniles de *Penaeus chinensis* (Xu *et al.*, 1993), mientras que de 0.5–1% para *P. monodon* (Chen y Tsai, 1986), así como para *P. vannamei* (González-Félix *et al.*, 2002b; 2003; Zhou *et al.*, 2007).

Se ha probado que al incrementar los niveles de n-3 HUFA (1%) en la dieta de *P. japonicus* juvenil, aumenta la concentración del contenido total de lípidos corporal (EPA y DHA) en el tejido de camarón y se reducen los niveles de ácido linoleico y del total de n-6 (PUFA) (Kontara *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha observado en *P. vannamei* que la inclusión de una mezcla de 0.5% de EPA y 1% de DHA, cumple con los requerimientos nutricionales para lograr un óptimo crecimiento (Lim *et al.*, 1997).

2.2.2 Metabolismo de ácidos grasos en camarón

La mayoría de los animales son capaces de sintetizar cadenas de ácidos grasos saturados a partir del acetato, o de adicionar dos unidades de carbono y más insaturaciones en el sitio del grupo carboxilo de un ácido graso, pero no del lado del grupo metilo (Tacon, 1989). En general, los enlaces dobles se introducen en ácidos grasos con 16 o 18 átomos de carbono, por lo que se puede decir que los AG insaturados se sintetizan a partir de un SFA, introduciendo enlaces dobles por medio de enzimas llamadas desaturasas (Δ desaturasa) (Brett *et al.*, 1997).

Sin embargo, los animales son incapaces de sintetizar *de novo* ácidos grasos con enlaces dobles en las posiciones n-6 (serie linoleica) y en la n-3 (serie linolénica) (Castell *et al.*, 1986). La posición de los dobles enlaces está determinada por el tipo de desaturasa, que se distribuyen de manera diferente entre organismos. Por ejemplo, la $\Delta 9$ desaturasa solo se encuentra en animales, la $\Delta 6$ desaturasa está presente en animales y plantas inferiores, y la $\Delta 15$ desaturasa solo se encuentra en algas y plantas con clorofila (Brett *et al.*, 1997).

La desaturación de ácidos grasos es una reacción aeróbica catalizada por la Δ desaturasa, una oxigenasa terminal que requiere equivalentes reductores derivados de NADPH, y administrados a través de una cadena de transporte de electrones que incluye el citocromo b5 y una reductasa. El proceso se efectúa en cuatro pasos, cada uno catalizado por una enzima específica. El primer paso es una reacción de condensación de la cadena del ácido graso precursora con malonil-CoA para producir una cadena de β -cetoacilo que posteriormente se hidrogena en tres pasos sucesivos. La etapa limitante de la velocidad del proceso es la condensación, que determina la especificidad del sustrato y, por lo tanto, se considera que es la enzima “elongasa” (Berg *et al.*, 2002).

La enzima elongasa es clave en la biosíntesis de ácidos grasos, participa en la elongación de los ácidos grasos y de productos, incluidos los fosfolípidos, en la estructura y el metabolismo del organismo (Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, hay poca información disponible sobre la síntesis de PUFA en la amplia gama de otros géneros de invertebrados acuáticos.

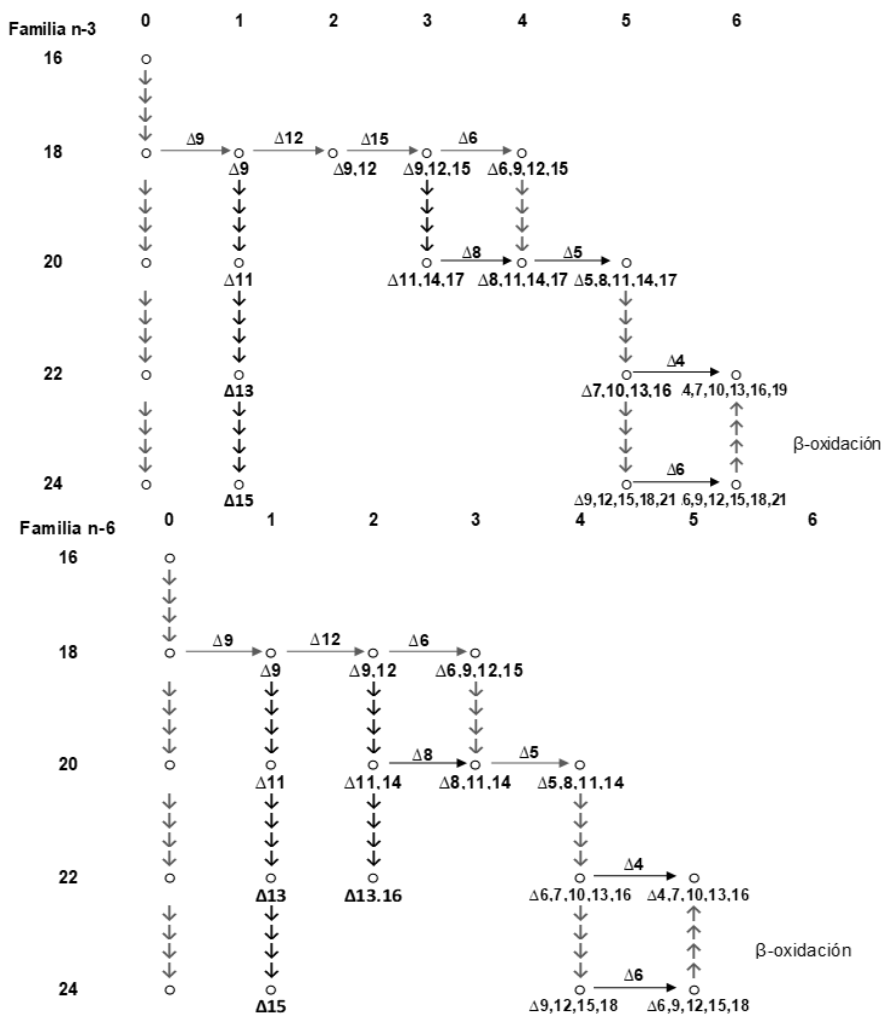


Figura 2. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados (Chen *et al.*, 2015a).

Las investigaciones sobre la nutrición de peneidos se complementan con otros métodos para demostrar que varios PUFA son esenciales. El análisis de los lípidos en los tejidos de los camarones después de una nutrición dada, ha mejorado la comprensión sobre el metabolismo de los ácidos grasos. El metabolismo de los ácidos grasos implica el transporte de los ácidos grasos de la hemolinfa a la célula muscular y a las mitocondrias, donde residen los componentes clave de la vía de la β-oxidación.

2.3 Uso de aceites vegetales en dietas para camarón

Generalmente las dietas son formuladas con ingredientes de origen animal y vegetal. Los ingredientes de origen animal son utilizados principalmente para satisfacer requerimientos proteicos y de ácidos grasos esenciales, especialmente a las especies carnívoras. Sin embargo, estos ingredientes generalmente son de mayor costo y de menor disponibilidad comparado con los de origen vegetal (Chamberlain y Choung, 1995).

En las dietas para camarón, se emplean la harina y el aceite de pescado como principales fuentes lipídicas, así como aceites y lecitina de soya provenientes de fuentes vegetales. Las harinas y aceites de pescado utilizadas en acuicultura provienen de pelágicos menores como sardinas, anchovetas y macarela. En los últimos años la sardina del Pacífico (*Sardinops sagax caeruleus*) se ha convertido en especie objetivo, por su calidad y abundancia, así como por el aporte de un 10% de lípidos en la harina y HUFA n-3 como el EPA (20.4%) y DHA (12.2%) contenidos en el aceite (Gámez-Meza *et al.*, 1999).

En la búsqueda por mejorar el rendimiento productivo de camarón, pero con la presión continua para reducir la utilización de los recursos marinos, se ha buscado incorporar/sustituir los ingredientes de origen animal por ingredientes vegetales. No obstante, al restringir estos componentes, las dietas pueden volverse limitantes en varios nutrientes, como los aminoácidos y los ácidos grasos esenciales (Samocho *et al.*, 2009) y tener un impacto en el crecimiento.

Las pruebas sobre la inclusión de aceites vegetales en alimentos acuícolas han mostrado poca influencia en el rendimiento de especies marinas como salmones, no obstante, estas dietas de prueba también han incluido niveles significativos de aceite y/o harina de pescado (Parrish, 2018).

La sustitución parcial del aceite de pescado por aceite vegetal puede alterar la calidad nutricional del camarón mediante la modificación de los perfiles de ácidos grasos musculares. Es probable que esta sustitución de lípidos marinos reduzca la

valiosa cadena larga ácidos grasos n-3 en los tejidos del camarón y que se introduzcan altos niveles de ácidos grasos n-6. Estas alteraciones son importantes desde el punto de vista de la nutrición y de la salud humana (Ouraji *et al.*, 2009; González-Félix *et al.*, 2010).

En estudios en camarón, se ha demostrado que el aceite de soya y el aceite de canola, que contienen altos niveles de ALA y LA, muestran un mejor valor nutricional en comparación con otros aceites ricos en ácido palmítico y ácido oleico como el aceite de cacahuete y la manteca de cerdo en sustitución al aceite de pescado (Kanazawa *et al.*, 1977; Zhou *et al.*, 2007).

Zhou *et al.*, en 2007 mostró que *P. vannamei* juvenil alimentado con una mezcla de aceite de bacalao y soya tenía un mejor rendimiento de crecimiento y un mayor contenido de HUFA en todo el cuerpo que otras fuentes de lípidos alimentarios como manteca de cerdo, aceite de cacahuete, aceite de soya y aceite de colza.

La mayor parte de los organismos puede producir SFA, sin embargo, la enzima fatty acid synthase (FAS) encargada de producir HUFA n-3 y n-6 a partir de PUFA C18 no se encuentra activa en animales, pero si en plantas. Diferentes estudios han demostrado que muchos crustáceos marinos carecen de las enzimas necesarias para sintetizar HUFA a partir de PUFA C18 (Sheen y Wu, 2003; Suprayudi *et al.*, 2004; Holme *et al.*, 2007). Sin embargo, Suprayudi *et al.*, en 2004 demostraron que en larvas de cangrejos de fango *Scylla serrata* alimentados con aceite de cártamo y aceite de semilla de perilla, se encontró una ligera mejora en la composición de ácidos grasos de ARA y EPA respectivamente, sugiriendo que este cangrejo puede tener la capacidad de bioconvertir PUFA C18 a HUFA.

Romano *et al.* (2012) describió la capacidad limitada o en cantidades insuficientes para satisfacer las necesidades metabólicas del crustáceo *Portunus pelagicus* juvenil para sintetizar HUFA a partir de una dieta con 12% de aceite vegetal (macadamia) sin inclusión de aceite de pescado.

Chen *et al.* (2015a) observaron que *P. vannamei* juvenil en un ambiente de baja salinidad (3 ups) y alimentado con una combinación de aceites de canola, linaza y cebo de vaca (α -linolénico), obtuvo mayor crecimiento que camarones alimentados con aceite pescado debido a la síntesis de PUFA por la participación del gen acyl-CoA thioesterase, así como otros genes asociados a las fuentes de lípidos que cambiaron significativamente vías relacionadas con el metabolismo energético y con la modulación de la estructura de la membrana celular.

Tabla V. Estudios realizados para sustituir aceite de pescado por aceite vegetal en camarones juveniles *P. vannamei*

Referencia	Lípidos utilizados	Duración	Efectos
Lim <i>et al.</i> , 1997	Siete lípidos (6.5% c/u): ácido esteárico, aceites de coco, cártamo, maíz, soya, linaza y aceite de pescado (<i>Brevoortia tyrannus</i>)	10 semanas	Mayor crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia y contenido de HUFA (EPA y DHA) con el aceite de pescado.
González-Félix <i>et al.</i> , 2003	Cinco lípidos (5% c/u), dieta basal con 2.5% de ácido palmítico y 2.5% de ácido esteárico: ácido linoleico 18:2n-6, ácido α -linoléico 18:3n-3, ARA (20:4n-6), EPA (20:5n-3), DHA 22:6n-3, mezcla de HUFA n-3	6 semanas	Mayor crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia y lípidos totales en los tratamientos con HUFA.
Zhou <i>et al.</i> , 2007	Seis lípidos (6% c/u): aceite de pescado (<i>Theragra chalcogramma</i>), manteca de cerdo, aceite de soya, aceite de cacahuate, aceite de colza y una mezcla de aceite de pescado + aceite de soya (1: 1).	8 semanas	Mayor crecimiento, eficiencia alimenticia, supervivencia, y contenido de HUFA n-3 con el aceite de pescado.
Kumar <i>et al.</i> , 2018	Harina de algas (<i>Schizochytrium sp.</i>), aceite de linaza (AL) y aceite de soya (AS): 5% aceite de pescado (AP), 8% AP, 4% AP + 2% AS + 2.8 % harina de alga, 2% AP + 2% aceites vegetales + 5.8% harina de alga, 2% aceites vegetales + 8.8% harina de alga.	12 semanas	Peso final inferior en el tratamiento donde hubo remplazo completo de aceite de pescado, sugiriendo que la harina de algas sólo podría reemplazar el aceite de pescado hasta en un 75%.
Cavalheiro <i>et al.</i> , 2019	Cuatro dietas con sebo de ternera y aceite de soya como principales fuentes de lípidos (8.5% de lípidos) y suplementadas con diferentes niveles de DHA-Nature™: 0.1, 1.7 y 0.4 % (con 240 y 70 g kg ⁻¹ DHA y EPA)	7 semanas	Mayor rendimiento de crecimiento con suplementación de 0.4% de DHA-Nature™

2.4 Efecto del alimento sobre la expresión de genes de camarón

Hoy en día se cuenta con herramientas de análisis molecular para conocer las respuestas fisiológicas bajo condiciones específicas como diferentes fuentes nutricionales, agentes patológicos o cualquier estresante en el sistema de cultivo del camarón. La nutrigenómica o genómica nutricional es la ciencia que trata de comprender cómo los diferentes componentes de la dieta influyen en los mecanismos moleculares que a su vez determinan la fisiología del camarón, y de esta forma encontrar estrategias para optimizar el uso de nutrientes y aumentar la calidad de los productos finales (Paoloni-Giacobino *et al.*, 2003).

A diferencia del genoma relativamente estable, en el transcriptoma se pueden observar variaciones con la etapa de desarrollo, la condición fisiológica y el ambiente externo de un organismo. La transcriptómica es el estudio que analiza qué porción del genoma es transcrito a ARNm (expresión génica) en una muestra biológica en un momento dado y en condiciones específicas (Chandhini y Rejish Kumar, 2018; Mutch *et al.*, 2005).

La transcriptómica en peneidos (Penaeidae) ha sido impulsada por el interés económico en las especies cultivadas, y de estas, *P. vannamei* es la especie más estudiada (Clavero *et al.*, 2007), donde cada vez más investigaciones se han centrado en el crecimiento y en mejorar la utilización alimentos benefician a una o varias funciones del organismo. La secuenciación del transcriptoma puede usarse para identificar de manera eficiente los transcritos de marcadores moleculares involucrados en importantes procesos biológicos (Powell *et al.*, 2015). Sin embargo, los datos de transcriptoma disponibles son insuficientes para los requisitos de investigación en relación con el tamaño de su genoma.

En estudios relacionados con expresión diferencial de genes por un estímulo nutricional, se ha visto que en comparación con una dieta “normal” las dietas basadas en ingredientes vegetales pueden alterar de forma significativa la expresión de genes en crustáceos (Peña-Rodríguez. 2011; Chen *et al.*, 2015a; Lin *et al.*, 2017; Shu-Chien *et al.*, 2017). A pesar de estos avances en nutrigenómica,

actualmente la información de la calidad de lípidos en la dieta y su efecto sobre la expresión de genes del camarón y el perfil de ácidos grasos es limitada.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* representa una de las principales industrias de producción de alimentos con gran importancia comercial y económica en México y en el mundo.

Los niveles de producción de camarón generan una alta demanda de alimento balanceado, que puede representar hasta el 60% de los costos totales de producción. Los aceites empleados en el alimento del camarón son un factor determinante dependiendo de su perfil de ácidos grasos, de los cuales algunos son esenciales para su crecimiento y desarrollo óptimo; sin embargo, actualmente la información sobre el efecto de diferentes aceites de la dieta sobre la expresión de genes en *P. vannamei* es limitada.

4. HIPÓTESIS

Si la calidad en términos del perfil de ácidos grasos de los aceites suministrados en el alimento del camarón tiene un efecto determinante en su desarrollo, entonces, se espera que camarones juveniles alimentados con inclusiones de aceite vegetal (canola) y animal (sardina y salmón) permita identificar genes asociados al crecimiento.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento, la expresión transcripcional, y el perfil de ácidos grasos del camarón *Penaeus vannamei* alimentado con inclusiones de aceite vegetal (canola) y animal (sardina y salmón)

5.2 Objetivos particulares

- I. Determinar el efecto de diferentes fuentes de lípidos en el crecimiento y perfil de ácidos grasos del camarón *P. vannamei*.
- II. Analizar la expresión transcripcional del camarón *P. vannamei* por efecto de diferentes aceites en la dieta.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos y análisis de la presente tesis fueron desarrollados en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) unidad La Paz, Baja California Sur, México y en la Plataforma Analítica LIPIDOCEAN en el Institut Universitare Européen de la Mer (IUEM) en Brest, Francia.

6.1 Formulación y elaboración de alimentos experimentales

La formulación de alimentos se realizó en el Laboratorio de Nutrición Acuícola de CIBNOR. Se elaboraron tres alimentos con diferentes aceites:

- Alimento con aceite de canola, el cual sustituyó al aceite de pescado (Canola).
- Alimento control de acuerdo a los requerimientos establecidos para la especie, para el cual se utilizó aceite de sardina (Sardina).
- Alimento con una mezcla de aceite de sardina y aceite de salmón (Sardina + Salmón)

Los alimentos fueron elaborados en la Planta de Alimentos de CIBNOR. Las harinas de pescado y de soya fueron previamente molidas en pulverizador y tamizadas a 0.45 mm. Los microingredientes (< 2% de la fórmula) y los macroingredientes (> 2% de la fórmula) de cada alimento fueron homogenizados en la mezcladora industrial Kitchenaid modelo K45SSWH. Se agregó la emulsión de aceites que contenía el aceite de pescado y la lecitina de soya, y se añadieron ~200 ml de agua purificada para hidratar la mezcla hasta lograr su homogenización.

La masa obtenida fue colocada en la extrusora marca Torey (1/2 hp) con dado de 2 mm para la formación de pellets de ~1cm. Los pellets se distribuyeron en charolas y se secaron a 40°C en un horno con flujo de aire por 12 horas para lograr el 10% de humedad. Los alimentos se dejaron enfriar a temperatura ambiente por una hora y fueron almacenados en bolsas re-sellables. Consecutivamente 50 g de cada alimento fueron utilizados para su análisis

químico proximal, y el resto fue almacenado en un refrigerador a 4°C hasta su uso en el ensayo de alimentación.

Tabla VI. Formulación de alimentos experimentales (g kg⁻¹)

Ingredientes (g 100g ⁻¹ alimento)	Canola	Sardina	Sardina + Salmón
Harina de trigo ^a	392.4	392.4	389.4
Harina de soya ^b	304	304	304
Harina de pescado ^c	220	220	220
Lecitina de soya ^d	35	35	35
CMC (aglutinante) ^e	15	15	15
Pre-mezcla vitaminas y minerales ^f	5.3	5.3	5.3
Vitamina C ^g	1	1	1
Antioxidante Bht ^h	0.3	0.3	0.3
Colina	1.5	1.5	1.5
Fosfato monosódico ^h	0.5	0.5	0.5
Aceite de canola ⁱ	25	0	0
Aceite de sardina ^a	0	25	16
Aceite de salmón ^j	0	0	12
Total	1000	1000	1000

^a Molino San Cristóbal, Sonora, MX; ^b Promotora Industrial Acuasistemas SA de CV (PIASA), BCS, MX; ^c Proteínas marinas y Agropecuarias SA de CV, Jalisco, MX; ^d Central de drogas, SA de CV, Edo. de México; ^e CMC= Carboximetilcelulosa, IMSA SA de CV, Ciudad de México, MX; ^f Premezcla (kg-1): Acetato de vitamina A, 5; vitamina D3, 0.001; vitamina E, 8; vitamina K3, 2; tiamina-HCl, 0,5; riboflavina (B2), 3; piridoxina-HCl, 1; ácido pantoténico, 5; ácido nicotínico, 5; biotina, 0.05; inositol, 5; vitamina B12, 0.002; ácido fólico, 0,18; celulosa, 865.3. Sigma-Aldrich, EUA; ^g Rovimix Stay C 35%, DSM, Países Bajos; ^h Sigma-Aldrich, EUA; ⁱ Canoil, Aceites, Grasas y Derivados, S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco, MX; ^j Nature's Life, Corporativo Pharma Kas, S.A. de C.V., Chihuahua, Chihuahua, MX.

6.2 Análisis químico proximal

Los alimentos elaborados fueron analizados en el Laboratorio de Análisis Químico Proximal de CIBNOR utilizando los métodos de la AOAC (1980). Se analizaron porcentajes de humedad, cenizas, proteínas, lípidos, fibra cruda, extracto libre de nitrógeno (E.L.N.), energía y nitrógeno total.

6.2.1 Determinación de humedad

Se pesaron 2 g de muestra por cada alimento en un crisol de porcelana previamente puesto a peso constante y se introdujeron en una estufa a 105°C para desecarla durante 4 h. Pasadas las 4 h se sacaron los crisoles de la estufa y se dejaron enfriar en un desecador por 30 minutos. Posteriormente se pesó la muestra seca y se realizaron los cálculos para determinar el porcentaje de humedad.

6.2.2 Determinación de cenizas

Se pesaron 2 g de muestra seca por cada alimento en un crisol de porcelana previamente puesto a peso constante a 600°C por 5 h. Enseguida se metieron a la Mufla Thermolyne 6000 para incinerar las muestras durante 5 h. Finalizadas las 5 h se apagó la mufla y el día siguiente se sacaron los crisoles de porcelana con las muestras incineradas, se colocaron en un desecador durante 30 min y se pesaron para determinar el porcentaje de cenizas con la fórmula:

$$\text{Cenizas} = \frac{\text{Peso de crisol con cenizas} - \text{Peso de crisol vacío}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (1)$$

6.2.3 Determinación de proteína

Se pesaron 200 mg de muestra seca por cada alimento sobre papel de estaño, y se analizaron con el método de combustión directa dumas, utilizando el equipo FP

528 de LECO®. La muestra envuelta en papel estaño se colocó en el cabezal de carga y fue purgada con gas atmosférico ingresado en el proceso de preparación. Continuando con la combustión, se ingresó la muestra al horno calentado a 850°C utilizando gas oxígeno puro para acelerar el proceso. Posteriormente, los gases obtenidos en la combustión fueron homogeneizados en el Ballast® por medio de una mezcla pasiva. El procedimiento se realizó en cuatro minutos y los resultados fueron obtenidos automáticamente por el software del equipo.

6.2.4 Determinación de lípidos

Se pesaron 2 g de muestra de cada alimento sobre un cartucho de celulosa previamente puesto a peso constate. Cada cartucho se colocó en un depósito del equipo de extracción de lípidos Soxtec Avanti. Se colocaron vasos de aluminio con 80 ml de éter de petróleo y se montaron en una parrilla que fue colocada en el equipo. Se corrió el programa de extracción por 70 min. Los cartuchos subieron automáticamente terminado el tiempo de inmersión y lavados. Se retiró el vaso de aluminio, se colocó en campana de extracción para terminar de secar la muestra; con una pinza se tomaron cada uno de los vasos y se colocaron en una estufa a 103°C por dos horas. Se sacaron los vasos con una pinza y se pusieron en un desecador por 30 min hasta enfriarse a temperatura al ambiente. Se pesó el vaso de aluminio + extracto etéreo y se calculó el porcentaje de lípidos según la formula correspondiente.

$$\text{Extracto etéreo} = \frac{\text{Peso del vaso} + \text{lípidos extraídos} - \text{Peso del vaso vacío}}{\text{Peso en g de la muestra}} \times 100 \quad (2)$$

6.2.5 Determinación de fibra cruda

Se pesó 1 g de muestra seca por cada alimento que fue previamente desengrasada en el equipo Soxtec-Avanti, en un crisol. La muestra se colocó en el equipo Fibertec 1020 para determinación de fibra cruda, se embonó el crisol y se

le agregaron 150 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄ al 1.25%, 0.255 N) previamente calentado. Se le agregaron unas gotas de octanol como antiespumante. La muestra fue hervida durante 30 minutos y posteriormente se bajó la temperatura a cero grados. Se colocó la bomba de vacío y se hizo el primer filtrado, enjuagando tres veces con agua destilada. Se le agregaron 150 ml de hidróxido de sodio (NaOH) previamente calentado y 1 ml de octanol; se repitió, la ebullición por 30 minutos, el filtrado y los 3 lavados con agua destilada, y se volvió a filtrar con la bomba de vacío. Se secaron los crisoles en estufa a 120°C por dos h. Se dejaron enfriar en un desecador por 30 minutos y se registró el peso. Las muestras se volvieron a meter a una mufla a 520°C por 20 minutos, se apagó la mufla y al día siguiente se sacaron y se enfriaron en un desecador por 30 minutos, y se pesaron los crisoles con la fibra cruda.

$$\text{Fibra Cruda} = \frac{\text{Peso en g del crisol a } 130^{\circ}\text{C} - \text{Peso en g del crisol+ceniza}}{\text{Peso en g de la muestra}} \times 100 \quad (3)$$

6.2.6 Determinación de energía

Se pesó 1 g de muestra en una cápsula de acero, esta se llevó al calorímetro y se colocó dentro del equipo sobre un hilo de algodón para ser quemada la muestra de 8 a 10 minutos.

6.2.7 Extracto libre de nitrógeno

Se calculó de la suma del porcentaje de proteínas, extracto etéreo, fibra cruda y cenizas.

$$\text{E.L.N} = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ ceniza}) \quad (4)$$

6.3 Ensayo *in vivo* de alimentación

El bioensayo de alimentación se realizó en el Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola del CIBNOR durante 28 días para determinar el rendimiento productivo de camarón *P. vannamei* alimentado con los tres diferentes tratamientos.

Los camarones juveniles se obtuvieron del laboratorio comercial Larvas Gran Mar, S.A. de C.V., ubicada en La Paz, Baja California Sur, México. Los organismos se aclimataron y mantuvieron en condiciones de laboratorio (28° C, > 4 mg L⁻¹ DO y 37 ups) durante una semana de prueba de alimentación previa.

Se utilizaron réplicas de 10 camarones por tratamiento y por triplicado, con un peso promedio inicial de 0.2 g. Los camarones fueron colocados en 9 acuarios bajo las siguientes condiciones controladas:

- Nivel de agua: 60 L de agua de mar filtrada a 1 µm y esterilizada por luz UV
- Temperatura: 28°C ± 0.3°C
- pH: 8
- Oxigenación: 5 ± 1.5 mg L⁻¹
- Recambio de agua: 50% diario cada mañana por sifoneo
- Alimentación: a saciedad en dos raciones (9:00 y 15:00 h), iniciando con el 10% de la biomasa y ajustando diariamente la tasa de alimentación de acuerdo al consumo. Se incrementó la ración cuando el consumo de alimento fue total, y se redujo la ración de alimento si se encontraban restos de alimento a la mañana del día siguiente.
- Fotoperiodo: luz 12 h / oscuridad 12 h
- Salinidad: 36 ± 0.4 ups

Al finalizar el ensayo *in vivo*, se realizó la biometría final de todos los camarones, sustrayendo los organismos de los acuarios para pesarlos individualmente y sumergirlos en nitrógeno líquido para provocar su muerte de manera rápida y así evitar la degradación de sus componentes. Se colocaron en bolsas individuales de

plástico rotuladas, para posteriormente almacenarse en un ultra-congelador a -80°C.

6.5 Parámetros zootécnicos considerados

- Biomasa del acuario: es la suma de los pesos individuales de los camarones presentes en un acuario. Esta variable refleja los efectos en conjunto del crecimiento y de la sobrevivencia (Peña-Rodríguez, 2011).
- Ganancia en peso individual (g): es el incremento en peso con respecto al peso individual promedio inicial. Donde pf = peso individual final del organismo y pi = peso individual inicial del organismo. Esta variable se calculó para cada acuario a partir del peso promedio inicial y del peso promedio final (Cruz-Suárez *et al.*, 1993).

$$GP = pf - pi \quad (5)$$

- Supervivencia (S%): es el porcentaje de los organismos vivos durante el tiempo de experimentación. Donde N_f = número final de organismos y N_i = Número inicial de organismos, multiplicado por 100 (Cruz-Suárez *et al.*, 1993).

$$S = \frac{N_f}{N_i} \times 100 \quad (6)$$

- Consumo de alimento: se consideró el total del alimento suministrado por camarón por día. Para cada acuario el consumo se reportó como la suma del consumo individual diario estimado a lo largo de n días de bioensayo (Cruz-Suárez *et al.*, 1993).

$$\text{Consumo individual} = \sum_1^n 1n \left(\frac{\text{consumo en el acuario al día } i}{\text{número de camarones al día } i} \right) \quad (7)$$

- Tasa de crecimiento (TC%): porcentaje de crecimiento por camarón con respecto al peso promedio inicial (Cruz-Suárez *et al.*, 1993).

$$TC = \frac{GP}{Pi} \times 100 \quad (8)$$

- Factor de conversión alimenticia (FCA%): es el alimento consumido por unidad de peso ganado (Cruz-Suárez *et al.*, 1993).

$$FCA = \frac{\text{Consumo individual}}{\text{Incremento en peso individual}} \times 100 \quad (9)$$

- Tasa de crecimiento específico (TCE%): Denota el crecimiento promedio del organismo al día (Ricker, 1975).

$$TCE = \frac{\log_e \text{ peso final} - \log_e \text{ peso inicial}}{\text{Periodo total de crecimiento}} \times 100 \quad (10)$$

6.6 Análisis de lípidos y del perfil de ácidos grasos

6.6.1 Extracción de lípidos

La etapa de extracción de lípidos se realizó en el laboratorio de Metabolismo de Lípidos en CIBNOR. Se pesaron 100 mg de muestra de cada alimento por duplicado, y 100 mg de músculo de camarón sin exoesqueleto por triplicado. A las muestras de alimento se les añadieron 400 µl de agua y se homogenizaron con pistilo. A cada muestra de alimento y de músculo se le añadieron 6 ml de solución Folch (cloroformo/metanol 2:1 v/v), 10 µl de estándar C23:0, y 10 µl de BHT. Las muestras de músculo fueron homogenizadas y posteriormente sonicadas durante 15 minutos en baño con hielo, para finalmente ser vortexeadas (Folch *et al.*, 1956). Se almacenaron a -20°C hasta su análisis de perfil de ácidos grasos.

6.6.2 Lípidos totales de músculo de camarón

Se realizó la determinación de lípidos totales por método gravimétrico (Folch., *et al.*, 1957), para lo cual se utilizaron 2ml de extracto lipídico considerado backup. El extracto se evaporó con nitrógeno gaseoso (N₂), para después agregar 1ml de solución de Folch. El extracto se filtró en una micro-columna con 1.5 cm de sílice, a la cual se añadieron 10 ml de solución de Folch. La muestra fue recuperada y evaporada a un volumen de 1 ml.

Tubos de borosilicato de 10 ml fueron puestos a peso constante en un horno a temperatura controlada (80°C por 24 h). Los tubos fueron colocados en un desecador, y después de una hora se registró el peso de cada uno de los tubos.

Se agregó el extracto lipídico filtrado a los tubos de borosilicato, y fue evaporado a sequedad con nitrógeno gaseoso. Los tubos con el extracto vaporado se colocaron en un horno de temperatura controlada (80°C por 24 h), para posteriormente ser colocados en un desecador durante una hora. Se registró el peso de cada tubo + lípidos.

6.6.3 Obtención de lípidos polares y neutros de músculo

El análisis de perfil de ácidos grasos de músculo de camarón se realizó en la plataforma analítica LIPIDOCEAN en Plouzané, Francia, utilizando el método de Mathieu-Resuge *et al.* (2019).

Se tomó 1 ml de cada muestra y se depositó en un vial de 7 ml, para ser evaporada a sequedad con nitrógeno. Posteriormente se realizaron tres lavados con 2 ml de solución cloroformo/metanol 98:2 v/v (CHCl₃/MeOH). Se inyectó la muestra (fase estacionaria) en una micro-columna con gel sílice y fibra de vidrio contenida en un tubo pasteur. La micro-columna se conectó con un contenedor de vidrio en la parte superior para consecutivamente depositar 10 ml de solución CHCl₃/MeOH 98:2 (fase móvil) y por gravedad recuperar los lípidos neutros en un tubo con capacidad de 20 ml.

Después de recuperar los lípidos neutros, sobre la micro-columna se depositaron 20 ml de MeOH y se recuperaron los lípidos polares en un tubo con capacidad de 20 ml con 20 µl de estándar C23:0 añadido previamente.

Los solventes de nueve tubos de lípidos neutros y nueve tubos de lípidos polares fueron evaporados durante 1.4 horas en el equipo Genevac® a temperatura de 29°C y a una presión 39 mbar. A continuación, a los tubos se les realizaron tres lavados con solución Folch, y el contenido se transfirió a viales 7 ml los cuales se pusieron a evaporar a sequedad con nitrógeno.

A cada tubo evaporado se le agregaron 800 μ l de ácido sulfúrico ($H_2SO_4/MeOH_3$) como catalizador para esterificación. Se cerraron los tubos para evitar derrames y se colocaron en una placa caliente a $96^\circ C$ durante 10 minutos. Después de los 10 minutos se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente.

En cada tubo se agregaron 1.5 ml de agua destilada saturada con hexano (Milli-Q) y 800 μ l de hexano. Los tubos fueron agitados durante un minuto y posteriormente fueron centrifugados a 1000 RPM durante un minuto. Con una pipeta pasteur fue recuperada la fase inferior con agua y fue desechada. En cada tubo se añadieron 1.5 ml de agua Milli-Q, se agitaron durante un minuto y de nuevo fueron centrifugados en las mismas condiciones. Los lavados con agua Milli-Q fueron repetidos tres veces. Después de la última centrifugación se metieron las muestras a un ultra congelador a $-20^\circ C$. Por último, se recuperó el sobrenadante de cada muestra y fue depositado en un vial ámbar de 1 ml de capacidad.

El análisis de perfil de ácidos grasos para lípidos polares, neutros y totales se realizó en el cromatógrafo de gases Varian CP-3800 por ionización de flama y dos columnas para separar FAME (ácidos grasos metil-esterificados): ZB WAX (Front) (Ref. 7HG-6007-11 Phenomenex) y la columna ZB 5HT (Middle) (Ref. 7HG-G015-02 Phenomenex) y el software Galaxie Chromatography Data System.

6.7 Análisis estadístico

Los datos de zootecnia y ácidos grasos se expresaron como la media de cada tratamiento \pm DE (desviación estándar) y se sometieron a un ANOVA de una sola vía en el programa SPSS[®] (Statistics de IBM para Windows, versión 25) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. Las diferencias significativas entre las medias se compararon mediante una prueba post hoc y de comparaciones múltiples de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

6.8 Análisis de expresión diferencial

6.8.1 Extracción de ARN

Posterior a los 28 días de alimentación, se obtuvieron muestras de músculo del segundo segmento del camarón y fueron conservadas en solución RNeasy® (Invitrogen). De estas muestras se realizó la extracción de ARN total utilizando TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ARN por fluorometría en Qubit® (Invitrogen™), y se determinó su concentración y pureza en NanoDrop (relación 260/280). El ARN precipitado en acetato de sodio y etanol, fue enviado a la compañía Genewiz (EUA) para su secuenciación.

6.8.2 Análisis bioinformático

Se realizaron dos librerías de cada tratamiento (canola, sardina, sardina + salmón) y cada librería se formó de cuatro camarones, con al menos un camarón de cada réplica para generar una librería. Las librerías fueron secuenciadas Paired-end (PE). Las librerías fueron secuenciadas en la plataforma Illumina® Hi-Seq 2500, obteniendo para cada librería 20 millones de lecturas pareadas (PE) 2 × 150 pb.

De cada librería se analizó la calidad de las secuencias con el programa FastQC versión 0.11.8 (Andrews *et al.*, 2011), identificando los adaptadores usados en la secuenciación y delimitando los parámetros a considerar para la limpieza.

Los adaptadores y las lecturas que no cumplieran con las especificaciones de calidad $Q < 30$, fueron eliminados con el programa TRIMMOMATIC 0.38 utilizando las opciones: PHRED 33, ILLUMINACLIP, LEADING, TRAILING, SLIDINGWINDOW, MINLEN (Anexo A).

Se utilizó el programa HISAT2 para alinear las lecturas de las librerías de cada tratamiento al genoma de referencia de *Penaeus vannamei* ASM378908v1 (Anexo B), siguiendo el protocolo de Pertea *et al.*, (2016) (Fig. 3).

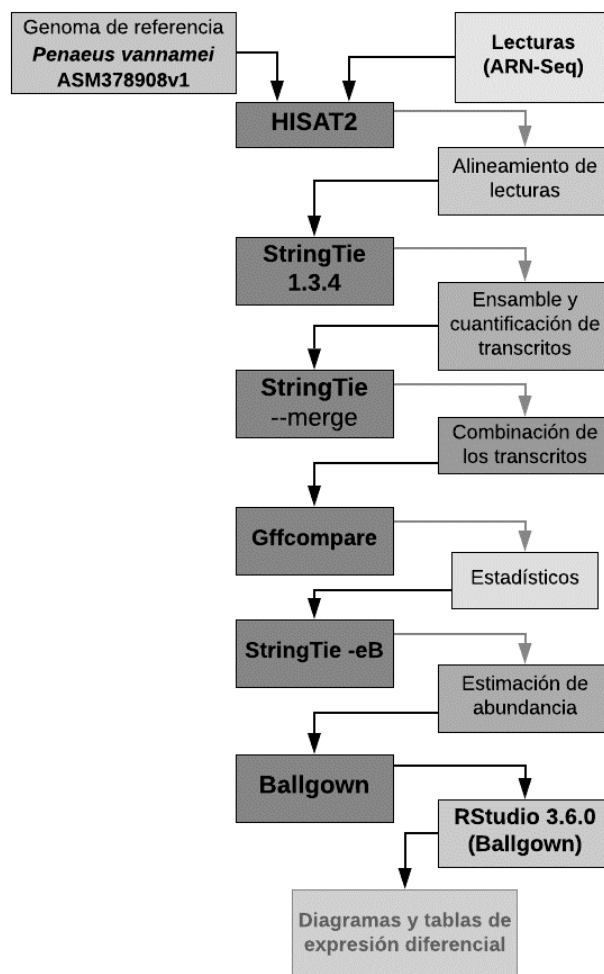


Figura 3. Protocolo de HISAT2 para realización de análisis bioinformático.

Se alinearon las lecturas para posteriormente ensamblar y cuantificar los genes y transcritos expresados en cada muestra utilizando el programa Stringtie 1.3.4. Con Gffcompare 0.10.8 se compararon los genes y los transcritos con la anotación de referencia para obtener los datos estadísticos. Posteriormente se procesaron las alineaciones de las lecturas y los transcritos combinados con la anotación del genoma de referencia para estimar las abundancias con Stringtie –eB, y se crearon tablas de transcripción para la entrada de Ballgown.

Se utilizó el programa Rstudio versión 3.6.0, los paquetes RSkittleBrewer (para configurar colores), genefilter (para el cálculo rápido de medias y varianzas), dplyr (para clasificar y organizar los resultados), devtools (para reproducibilidad e instalación de paquetes) y Ballgown de Bioconductor para filtrar las abundancias más bajas de los genes y transcritos (varianza entre las muestras de menos de uno), así como para identificar los genes y transcritos estadísticamente diferentes entre los tratamientos y que cumplieran con un valor umbral de $q = 0.05$.

Se extrajeron las secuencias de los genes expresados diferencialmente (.fasta) utilizando el programa fastagrep.pl y el genoma de referencia de *Penaeus vannamei* ASM378908v1 (.fna), para obtener la anotación funcional de estos genes con el programa Trinotate 3.0.2 y la base de datos de Uniprot por medio de blastx (nucleótidos) con el programa ncbi-blast 2.9.0+.

Se realizó un análisis de componentes principales en el programa STATISTICA (StatSoft. Inc., versión 7.0) para determinar si existen patrones de distribución de datos de acuerdo con los diferentes tratamientos y los genes expresados diferencialmente.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis químico proximal de alimentos

Los alimentos elaborados presentaron un contenido de 37% de proteína y de 7–8% de lípidos.

Tabla VII. Resultados obtenidos del análisis químico proximal a los alimentos utilizados durante el ensayo de alimentación (base seca).¹

Tratamientos	Humedad (%)	Proteína (%)	Extracto Etéreo (%)	Fibra Cruda (%)	Cenizas (%)	ELN ² (%)
Canola	6.26 ± 0.05	37.49 ± 0.17	7.912 ± 0.03	0.83 ± 0.06	8.39 ± 0.03	45.38
Sardina	7.48 ± 0.03	38.15 ± 0.11	7.73 ± 0.07	1.23 ± 0.06	8.44 ± 0.02	44.44
Sardina+Salmón	6.58 ± 0.06	37.87 ± 0.05	8.36 ± 0.06	1.23 ± 0.06	8.35 ± 0.05	44.19

¹ Los valores representan la media del triplicado por tratamiento ± DE. ² Extracto libre de nitrógeno.

7.2 Supervivencia y rendimiento productivo

Al finalizar el ensayo de alimentación, en los tres tratamientos hubo supervivencia > 90%, en este parámetro no se encontraron diferencias significativas (Tabla VIII).

De acuerdo con los datos obtenidos después del ensayo de alimentación y de los análisis estadísticos realizados, se observaron diferencias significativas en los parámetros de peso final, tasa de crecimiento, tasa de crecimiento específico, consumo de alimento y factor de conversión alimenticia. Se observó el incremento de peso en los organismos cuyas dietas contenían aceite de pescado en su formulación (Fig. 4), a diferencia del tratamiento en el que se utilizó aceite vegetal ($P < 0.05$).

Tabla VIII. Supervivencia de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes de lípidos¹.

Tratamientos	Supervivencia (%)
Canola	100
Sardina	100
Sardina+Salmón	96.66 ± 5.78

¹ Los valores representan la media del triplicado o duplicado por tratamiento ± DE

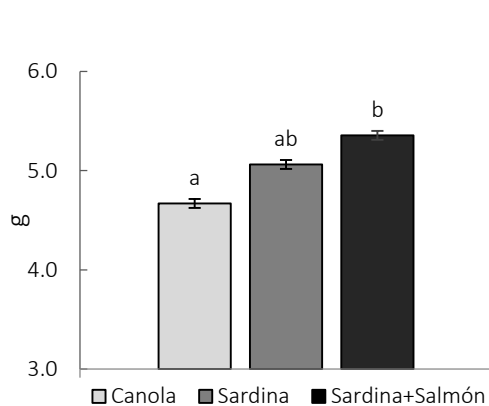


Figura 4. Peso Final.

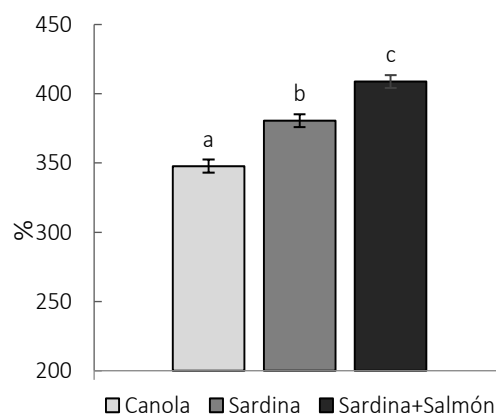


Figura 5. Tasa de crecimiento

Respecto a la tasa de crecimiento (Fig. 5) se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos, siendo superiores los organismos del tratamiento 'sardina + salmón' ($P < 0.05$), de la misma forma con lo observado en la tasa de crecimiento específico (Fig. 6).

Los organismos del tratamiento 'sardina' (control) consumieron significativamente más alimento en comparación con los organismos del tratamiento 'canola' ($P < 0.05$) (Fig. 7), pero sin representar diferencias significativas respecto al alimento con 'sardina + salmón'. En relación al factor de conversión alimenticia, los valores obtenidos fueron de 1.5 en los tratamientos 'sardina' y 'canola,

presentando diferencias significativas ($P<0.05$) con respecto al tratamiento 'sardina + salmón' (Fig. 8).

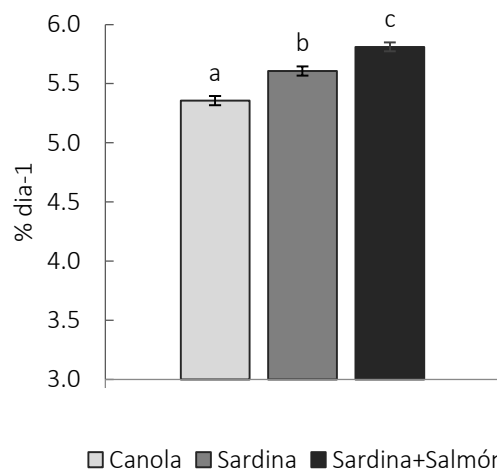


Figura 6. Tasa de crecimiento específico

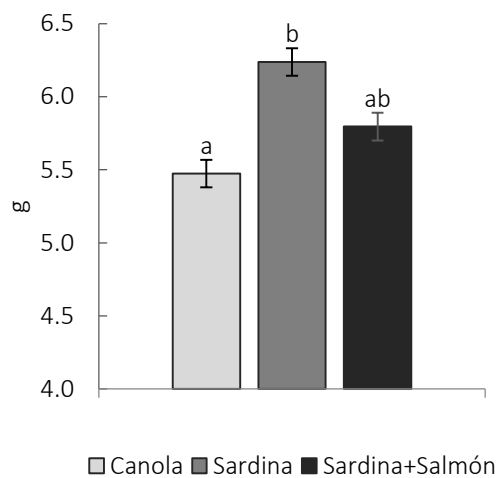


Figura 7. Consumo de alimento

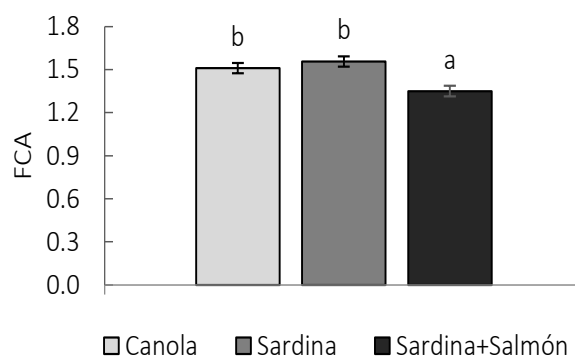


Figura 8. Factor de conversión alimenticia

7.3 Lípidos totales en músculo de camarón

En la Tabla IX se muestran los resultados del contenido de lípidos totales en porcentaje (%), siendo mayor en el músculo de los camarones del tratamiento 'canola', seguido del tratamiento 'sardina + salmón', y en menor concentración el tratamiento 'sardina'.

Tabla IX. Porcentaje de lípidos totales del músculo de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas¹

Tratamientos	Lípidos totales (%)
Canola	6.147 ± 0.69
Sardina	3.758 ± 0.90
Sardina + Salmón	5.365 ± 0.62

¹ Los valores representan la media de las muestras triplicadas + DE.

7.4 Perfil de ácidos grasos

7.4.1 Dietas experimentales

Las dietas experimentales mostraron una composición proximal similar (Tabla VII), pero una composición de ácidos grasos diferente (Tabla XI). Los alimentos con aceite de pescado presentaron mayor contenido de PUFA y HUFA, respecto a la dieta 'canola'. Además los tres alimentos fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) respecto al contenido de ácidos grasos n-3 y n-6, presentando mayor concentración de n-3 el tratamiento 'sardina + salmón' y por el contrario, hubo mayor concentración de n-6 en 'canola' (Tabla X).

Tabla X. Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de alimento, base húmeda) en dietas experimentales^{1, 2}

Ácidos grasos	Tratamientos		
	Canola	Sardina	Sardina + Salmón
14:0	1.76 \pm 0.07 ^b	1.44 \pm 0.07 ^a	1.52 \pm 0.04 ^a
16:0	14.65 \pm 0.07 ^b	7.17 \pm 0.02 ^a	7.33 \pm 0.08 ^a
18:0	3.81 \pm 0.02 ^b	1.70 \pm 0.02 ^a	1.78 \pm 0.04 ^a
16:1n-7	2.16 \pm 0.04 ^b	1.67 \pm 0.06 ^a	1.71 0.09 ^a
18:1n-9	29.08 \pm 0.65 ^b	4.08 \pm 0.00 ^a	4.09 \pm 0.15 ^a
18:1n-7	2.50 \pm 0.03 ^b	0.83 \pm 0.00 ^a	0.88 \pm 0.02 ^a
16:2n-4	0.22 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.16 \pm 0.07
18:2n-6	33.27 \pm 0.16 ^b	9.79 \pm 0.09 ^a	9.18 \pm 0.55 ^a
18:3n-3	6.23 \pm 0.09 ^b	1.23 \pm 0.00 ^a	1.19 0.07 ^a
18:4n-3	0.16 \pm 0.00 ^a	0.28 \pm 0.01 ^b	0.36 \pm 0.00 ^c
20:4n-6	0.79 \pm 0.00 ^b	0.51 \pm 0.00 ^a	0.50 \pm 0.00 ^a
20:5n-3	2.10 \pm 0.02 ^a	2.31 \pm 0.02 ^b	2.66 \pm 0.02 ^c
21:5n-3	0.28 \pm 0.03 ^b	0.14 0.00 ^a	0.14 0.03 ^a
22:5n-3	0.25 \pm 0.02	0.25 \pm 0.04	0.28 \pm 0.01
22:6n-3	2.30 \pm 0.00	2.30 \pm 0.00	2.30 \pm 0.00
Saturados ³	21.39 ^a	10.84 ^b	11.20 ^b
Mono-insaturados ⁴	33.74 ^b	6.58 ^a	6.67 ^a
PUFA y HUFA ⁵	45.66	17.12	16.96
Total n-3 ⁶	11.37	6.61	7.12
Total n-6 ⁷	34.06	10.30	9.68

¹ Los valores representan la media de las muestras duplicadas \pm DE. Los valores de ácidos grasos ($\mu\text{g FAME}$) se ajustaron para expresar un porcentaje del área total identificada en los cromatogramas, los picos no identificados no se consideraron en los cálculos. ² La media dentro de las columnas con la misma letra no es significativamente diferente (Tukey $\alpha = 0.05$). ³ 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0; ⁴ 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7; ⁵ 16:2n-4, 16:4n-3, 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 21:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁶ 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3, 21:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁷ 18:2n-6, 20:4n-6.

Tabla XI. Composición relativa de ácidos grasos (%) en dietas experimentales^{1,2}

Ácidos grasos	Tratamientos		
	Canola	Sardina	Sardina+Salmón
14:0	1.74 ± 0.05 ^a	4.15 ± 0.17 ^b	4.33 ± 0.02 ^b
16:0	14.52 ± 0.24 ^a	20.69 ± 0.08 ^b	20.98 ± 0.70 ^b
18:0	3.77 ± 0.01 ^a	4.92 ± 0.08 ^b	5.10 ± 0.24 ^b
16:1n-7	2.14 ± 0.02 ^a	4.81 ± 0.14 ^b	4.88 ± 0.14 ^b
18:1n-9	28.81 ± 0.30 ^b	11.76 ± 0.08 ^a	11.68 ± 0.17 ^a
18:1n-7	2.47 ± 0.04	2.39 ± 0.01	2.51 ± 0.12
18:2n-6	32.96 ± 0.21 ^b	28.25 ± 0.48 ^a	26.24 ± 1.01 ^a
18:3n-3	6.17 ± 0.02 ^b	3.54 ± 0.04 ^a	3.40 ± 0.11 ^a
18:4n-3	0.15 ± 0.00 ^a	0.80 ± 0.02 ^b	1.02 ± 0.02 ^c
20:4n-6	0.78 ± 0.00 ^a	1.47 ± 0.00 ^b	1.42 ± 0.05 ^b
20:5n-3	2.07 ± 0.00 ^a	6.68 ± 0.02 ^b	7.60 ± 0.07 ^c
22:5n-3	0.25 ± 0.01 ^a	0.72 ± 0.10 ^b	0.80 ± 0.07 ^b
22:6n-3	2.28 ± 0.02 ^a	6.63 ± 0.04 ^b	6.58 ± 0.14 ^b
Saturados³	21.19 ± 0.14 ^a	31.27 ± 0.08 ^b	32.02 ± 0.85 ^b
Mono-insaturados⁴	33.43 ± 0.38 ^b	18.96 ± 0.04 ^a	19.07 ± 0.19 ^a
PUFA y HUFA⁶	44.66 ^a	48.09 ^b	47.06 ^b
Total n-3⁷	11.27 ^a	19.07 ^b	20.35 ^c
Total n-6⁸	33.75 ^b	29.77 ^a	27.66 ^a

¹ Los valores representan la media de las muestras duplicadas ± DE. Los valores de ácidos grasos (% FAME) se ajustaron para expresar un porcentaje del área total identificada en los cromatogramas, los picos no identificados no se consideraron en los cálculos. ² La media dentro de las columnas con la misma letra no es significativamente diferente (Tukey $\alpha = 0.05$). ³ 14:0, 16:0, 18:0; ⁴ 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7; ⁵ 18:2n-6, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁶ 18:3n-3, 18:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁷ 18:2n-6, 20:4n-6.

7.4.2 Fracciones polares y neutras de músculo

La composición de los AG del músculo de camarón de los tres tratamientos, se vio afectada por la composición de los lípidos de las dietas. Los niveles de 20: 5n-3 (EPA) y 22: 6n-3 (DHA) fueron significativamente más altos en 'sardina + salmón' y en 'sardina'. La mayor concentración de PUFA y HUFA fue observada en las fracciones polares y por el contrario, los AG saturados fueron más abundantes en las fracciones neutras. Los niveles de ALA (18: 3n-3) y LA (18: 2n-6) fueron más altos en el tratamiento 'canola', debido a la contribución del aceite vegetal.

El porcentaje de PUFA y HUFA, y del total de AG n-3 en la fracción polar (Tabla XIV) fue significativamente más alto para la dieta 'sardina' respecto al tratamiento 'canola', mientras que en el resultado del porcentaje total de AG n-6 fue significativamente mayor para el tratamiento 'canola' en relación con los otros dos tratamientos. Para la fracción neutra no se encontraron diferencias significativas respecto a porcentajes o concentración (μg) entre los tres tratamientos.

Tabla XII. Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g mg}^{-1}$ músculo, base húmeda) en la fracción lipídica polar de músculo de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas^{1, 2}

Ácidos grasos	Tratamientos		
	Canola	Sardina	Sardina + Salmón
Fracción Polar			
14:0	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.01
16:0	11.60 ± 0.89	10.99 ± 0.73	9.99 ± 0.25
18:0	7.26 ± 1.08	6.93 ± 0.98	6.44 ± 0.35
16:1n-7	0.41 ± 0.05 ^a	0.63 ± 0.04 ^b	0.63 ± 0.04 ^b
18:1n-9	10.24 ± 2.02 ^b	5.32 ± 0.92 ^a	4.25 ± 0.12 ^a
18:1n-7	2.17 ± 0.47	1.98 ± 0.08	1.62 ± 0.08
18:2n-6	11.61 ± 1.59 ^b	7.69 ± 0.41 ^a	7.11 ± 0.54 ^a
18:3n-3	1.07 ± 0.15 ^b	0.37 ± 0.01 ^a	0.40 ± 0.03 ^a
20:2n-6	1.12 ± 0.25	0.96 ± 0.19	0.74 ± 0.03
20:4n-6	2.20 ± 0.45	2.11 ± 0.23	1.69 ± 0.17
20:5n-3	6.29 ± 0.95	8.10 ± 0.97	7.37 ± 0.73
22:5n-6	0.22 ± 0.06 ^b	0.25 ± 0.09 ^b	0.00 ^a
22:5n-3	0.40 ± 0.04	0.50 ± 0.18	0.46 ± 0.05
22:6n-3	6.76 ± 0.89	7.90 ± 0.79	6.58 ± 0.84
Saturados³	18.86	22.55	20.05
Mono-insaturados⁴	24.43	15.61	13.61
PUFA y HUFA⁵	29.67	27.88	24.35
Total n-3⁶	14.52	16.86	14.81
Total n-6⁷	15.16	11.01	9.54

¹ Los valores representan la media de las muestras triplicadas ± DE. Los valores de ácidos grasos (% FAME) se ajustaron para expresar un porcentaje del área total identificada en los cromatogramas, los picos no identificados no se consideraron en los cálculos. ² La media dentro de las columnas con la misma letra no es significativamente diferente (Tukey $\alpha = 0.05$). ³ 16:0, 17:0, 18:0; ⁴ 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7; ⁵ 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁶ 18:3n-3, 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁷ 18:2n-6, 20:4n-6.

Tabla XIII. Concentración de ácidos grasos ($\mu\text{g mg}^{-1}$ músculo, base húmeda) de la fracción lipídica neutra de músculo de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas^{1, 2}

Ácidos grasos	Tratamientos		
	Canola	Sardina	Sardina + Salmón
Fracción neutra			
16:0	0.86 ± 0.21	1.09 ± 0.31	0.95 ± 0.08
18:0	0.65 ± 0.14	0.95 ± 0.25	0.78 ± 0.06
18:1n-9	0.66 ± 0.65 ^c	0.41 ± 0.06 ^b	0.29 ± 0.03 ^a
18:1n-7	0.11 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.09 ± 0.00
18:2n-6	0.47 ± 0.11	0.44 ± 0.14	0.32 ± 0.02
18:3n-3	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.06	0.05 ± 0.02
20:2n-6	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.00
20:4n-6	0.15 ± 0.00	0.19 ± 0.05	0.12 ± 0.01
20:5n-3	0.23 ± 0.02	0.31 ± 0.10	0.30 ± 0.04
22:5n-3	0.04 ± 0.00	0.00	0.10 ± 0.08
22:6n-3	0.17 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.22 ± 0.09
Saturados³	1.51	2.05	1.73
Mono-insaturados⁴	0.76	0.58	0.38
PUFA y HUFA⁵	1.24	1.39	1.14
Total n-3⁶	0.56	0.69	0.67
Total n-6⁷	0.68	0.70	0.47

¹ Los valores representan la media de las muestras triplicadas ± DE. Los valores de ácidos grasos (% FAME) se ajustaron para expresar un porcentaje del área total identificada en los cromatogramas, los picos no identificados no se consideraron en los cálculos.² La media dentro de las columnas con la misma letra no es significativamente diferente (Tukey $\alpha = 0.05$).³ 16:0, 17:0, 18:0; ⁴ 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7; ⁵ 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁷ 18:3n-3, 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁸ 18:2n-6, 20:4n-6.

Tabla XIV. Composición relativa de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de la fracción lipídica polar de músculo de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas^{1,2}

Ácidos grasos	Tratamientos		
	Canola	Sardina	Sardina+Salmón
Fracción Polar			
14:0	0.19 ± 0.02	0.26 ± 0.06	0.34 ± 0.04
16:0	17.14 ± 1.28	18.78 ± 0.72	19.43 ± 0.98
17:0	1.05 ± 0.04 ^a	1.22 ± 0.08 ^b	1.23 ± 0.08 ^b
18:0	10.65 ± 0.46 ^a	11.79 ± 0.03 ^{ab}	12.53 ± 0.08 ^b
16:1n-7	0.57 ± 0.03 ^b	1.08 ± 0.16 ^a	1.22 ± 0.04 ^a
18:1n-9	14.93 ± 0.92 ^b	9.02 ± 0.74 ^a	8.26 ± 0.21 ^a
18:1n-7	3.18 ± 0.41	3.39 ± 0.26	3.15 ± 0.02
18:2n-6	17.07 ± 1.03 ^b	13.16 ± 0.34 ^a	13.79 ± 0.34 ^a
18:3n-3	1.59 ± 0.04 ^b	0.63 ± 0.08 ^a	0.78 ± 0.34 ^a
20:2n-6	1.64 ± 0.18	1.63 ± 0.18	1.43 ± 0.10
20:4n-6	3.21 ± 0.28	3.59 ± 0.12	3.27 ± 0.17
20:5n-3	9.25 ± 0.74 ^a	13.81 ± 0.96 ^b	14.29 ± 0.64 ^b
22:6n-3	9.93 ± 0.17 ^a	13.48 ± 0.63 ^b	12.74 ± 0.92 ^b
Saturados³	30.55 ± 1.39 ^a	33.20 ± 0.29 ^{ab}	34.74 ± 2.18 ^b
Mono-insaturados⁴	19.78 ± 1.40 ^b	14.42 ± 0.46 ^a	13.16 ± 0.27 ^a
PUFA y HUFA⁵	42.69 ^a	46.30 ^b	46.30 ^b
Total n-3⁶	20.77 ^a	27.92 ^b	27.81 ^b
Total n-6⁷	21.92 ^b	18.38 ^a	18.49 ^a

¹ Los valores representan la media de las muestras triplicadas ± DE. Los valores de ácidos grasos (% FAME) se ajustaron para expresar un porcentaje del área total identificada en los cromatogramas, los picos no identificados no se consideraron en los cálculos.² La media dentro de las columnas con la misma letra no es significativamente diferente (Tukey $\alpha = 0.05$). ³ 16:0, 17:0, 18:0; ⁴ 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7; ⁵ 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁶ 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁷ 18:2n-6, 20:4n-6.

Tabla XV. Composición relativa de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) de la fracción lipídica neutra de músculo de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas^{1,2}

Ácidos grasos	Tratamientos		
	Canola	Sardina	Sardina+Salmón
Fracción neutra			
16:0	21.33 ± 0.99 ^a	24.40 ± 2.24 ^{ab}	26.33 ± 1.55 ^b
17:0	1.08 ± 0.12	2.66 ± 2.12	1.70 ± 0.55
18:0	16.35 ± 1.12 ^a	21.17 ± 0.47 ^b	21.80 ± 2.08 ^b
20:0	1.28 ± 0.19	1.23 ± 0.56	1.42 ± 0.24
22:0	1.81 ± 0.52 ^b	0.00 ^a	1.25 ± 0.26 ^b
18:1n-9	16.22 ± 0.84 ^b	9.37 ± 0.97 ^a	8.08 ± 0.17 ^a
18:1n-7	2.69 ± 0.35	3.83 ± 0.73	2.70 ± 0.19
18:2n-6	11.69 ± 0.18 ^b	9.82 ± 1.11 ^{ab}	8.97 ± 1.19 ^a
18:3n-3	2.93 ± 0.30	2.90 ± 1.47	1.58 ± 0.60
20:2n-6	1.43 ± 0.16	1.48 ± 0.46	0.86 ± 0.24
20:4n-6	3.85 ± 0.75	4.38 ± 1.31	3.52 ± 0.37
20:5n-3	5.92 ± 0.63	7.24 ± 2.06	8.34 ± 1.18
22:5n-3	1.05 ± 0.05	0.00	2.56 ± 1.81
22:6n-3	4.34 ± 0.21	5.50 ± 0.29	6.12 ± 1.57
Saturados³	41.84 ± 1.56 ^b	51.19 ± 1.95 ^b	52.49 ± 4.16 ^b
Mono-insaturados⁴	19.60 ± 1.08 ^b	13.20 ± 1.48 ^a	11.30 ± 0.37 ^a
PUFA y HUFA⁵	31.21	31.32	31.95
Total n-3⁶	14.24	15.64	18.60
Total n-6⁷	16.97	15.68	13.35

¹ Los valores representan la media de las muestras triplicadas ± DE. Los valores de ácidos grasos (% FAME) se ajustaron para expresar un porcentaje del área total identificada en los cromatogramas, los picos no identificados no se consideraron en los cálculos.² La media dentro de las columnas con la misma letra no es significativamente diferente (Tukey $\alpha = 0.05$). ³ 16:0, 17:0, 18:0; ⁴ 16:1n-7, 18:1n-9, 18:1n-7; ⁵ 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁶ 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3; ⁷ 18:2n-6, 20:4n-6.

7.5 Análisis transcripcional

7.5.1 Limpieza de lecturas

Las secuencias de los tres tratamientos presentaron valores de calidad mayores a 30 ($Q > 30$). La longitud de las lecturas fue como se esperaba (151 pb), indicando que las lecturas fueron de buena calidad, como se puede observar un ejemplo en la Fig. 9.

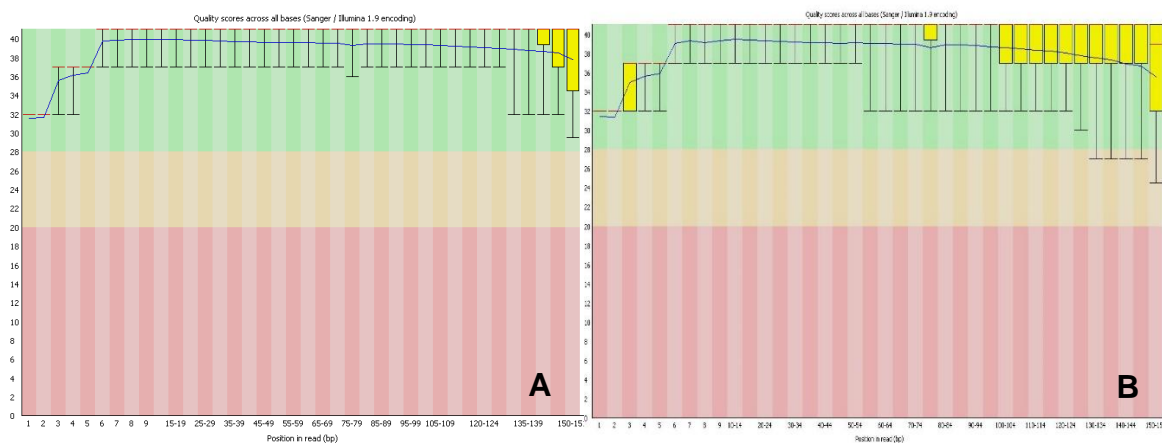


Figura 9. Calidad de las lecturas de las librerías de los camarones del tratamiento 'Sardina'. Forward (A), reverse (B). Eje Y: valor de Q; Eje X: posición de los nucleótidos en pares de bases.

7.5.2 Alineamiento y ensamble del transcriptoma

En la Tabla XVI se muestran las tasas de alineación para el conjunto completo de datos. Aunque en general $> 70\%$ de las lecturas están alineadas, alrededor de $>15\%$ de ellas se asignan en más de un sitio.

Tabla XVI. Estadística del mapeo de las lecturas en el conjunto de datos completo

Muestras (id)	Número de lecturas	Lecturas alineadas una vez (%)	Lecturas multimapeadas (%)	Tasa de alineación en general (%)
Canola-1	25740805	50.41	16.01	75.15
Canola-2	21139637	46.54	15.31	70.94
Sardina-1	24927438	51.08	15.68	75.58
Sardina-2	27447122	51.86	15.97	76.63
Sardina + salmon-1	24373081	47.46	18.6	74.72
Sardina + salmon-2	25930227	51.03	16.89	76.72

Se obtuvo un súper loci de 32366 pb del genoma de referencia de *P. vannamei* donde las transcripciones de referencia se agruparon o vincularon en el ensamble del transcriptoma. Se encontraron 45903 transcripciones consenso que fueron ensambladas y fusionadas (0 descartado como redundante). 39647 transcritos fueron coincidentes, de los cuales el 3.2% corresponde a nuevos exones, ver Anexo I.

7.6 Análisis de expresión diferencial

7.6.1 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 10) permitió caracterizar tres grupos de acuerdo a la estimación de la expresión génica (FPKM + 1). El PCA generó dos componentes principales (CP) que explicaron el 65.33% de la varianza total de los datos (CP1= 40.50%, CP2=24.83%). En la proyección de CP1 y CP2, se observa que el tratamiento 'sardina' presenta mayor correlación con el primer componente, mientras que el segundo componente estaría representado por el

tratamiento 'sardina+salmón'. Las réplicas del tratamiento 'canola' presentaron mayor variabilidad, y se dispersan hacia los valores negativos de CP1 y CP2.

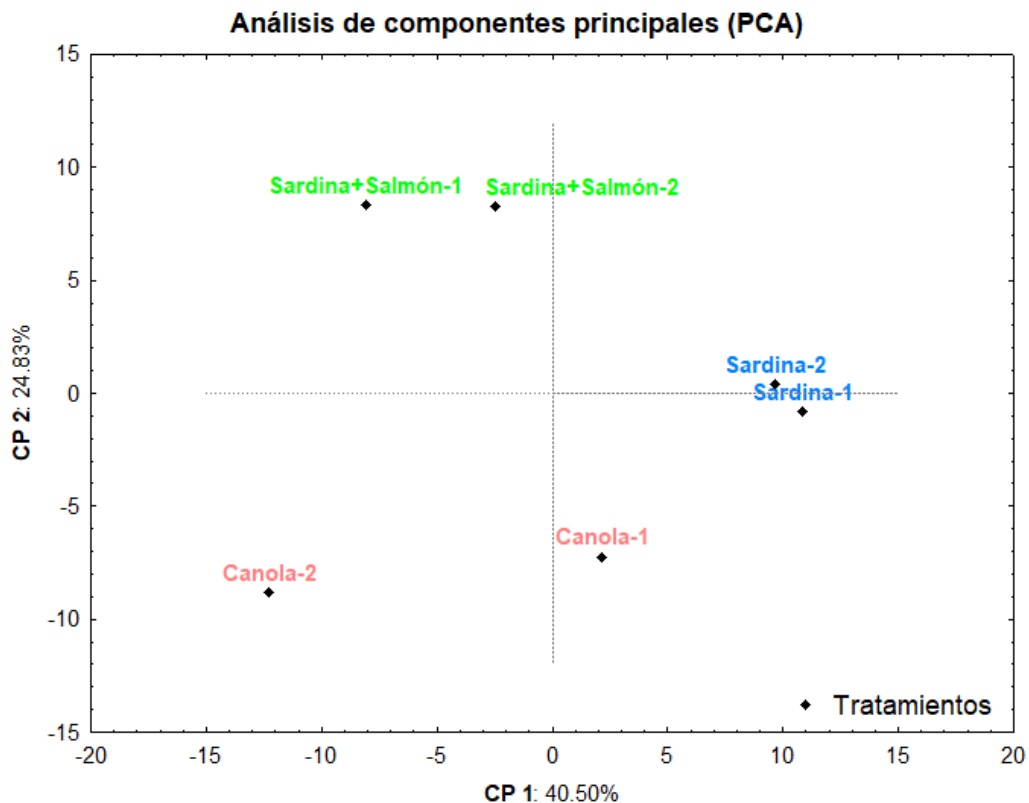


Figura 10. Análisis de componentes principales de la expresión génica de camarones por tratamiento y sus réplicas.

Se encontraron 216 genes expresados diferencialmente ($P < 0.05$) entre los tratamientos 'canola', 'sardina' y 'sardina + salmón'. Entre ellos se encontraron genes potencialmente relacionados con el metabolismo de lípidos, como las enzimas que intervienen en la síntesis de lípidos y en la β -oxidación, genes relacionados con el desarrollo de músculo y/o contracción muscular como actinas y miosinas, así como genes relacionados con estrés o daño oxidativo como la súper oxido dismutasa (SOD) (Tabla XVII).

Tabla XVII. Genes expresados diferencialmente entre los tres tratamientos y potencialmente relacionados con el metabolismo de lípidos, funciones musculares y estrés o daño oxidativo.

Gen	Nombre	Función biológica o molecular	Valor p
ACAT1	acetyl CoA acetyltransferase	Enzima que cataliza el último paso en la ruta de la β -oxidación mitocondrial	0.008
ACSL4	long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4	Cataliza la conversión de ácidos grasos de cadena larga a su forma activa acil-CoA en síntesis de lípidos celulares y en la β -oxidación	0.041
ACAA2	ketoacyl CoA thiolase	Proceso aeróbico que descompone los ácidos grasos en acetil-CoA.	0.047
EPRS	bifunctional glutamate/proline tRNA ligase	Promueve la absorción de ácidos grasos de cadena larga por los adipocitos	0.047
HADH	hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase	Participa en la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena corta	0.047
Bin1	myc box dependent interacting protein 1	Es requerido en las células musculares para la formación de túbulos.	7.113 ^{E-05}
Unc-89	obscurin	Componente estructural del músculo	0.000
act1	actin	Contracción muscular	0.002
TPM1	tropomyosin	Regulación dependiente de calcio de la contracción del músculo estriado de vertebrados.	0.003
Mhc	myosin heavy chain	Contracción muscular	0.006
PRKRA	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A	Respuesta celular ante el estrés oxidativo	0.047
SOD2	superoxide dismutase [Mn]	Acción antioxidante	0.049

7.6.2 Expresión diferencial entre camarones alimentados con aceite vegetal y aceite de pescado

Se identificaron 86 genes expresados diferencialmente ($P < 0.05$) entre el tratamiento 'canola' y entre los dos tratamientos en los cuales se utilizó aceite de pescado ('sardina', 'sardina + salmón'), algunos asociados a funciones biológicas relacionadas con el metabolismo de lípidos y crecimiento como se esperaba. 52 genes estuvieron sub-expresados 34 sobre-expresados en camarones alimentados con aceite vegetal respecto a los camarones alimentados con aceite de pescado. Los genes se clasificaron respecto al proceso biológico en el que participan (Fig. 11), encontrando mayor número de genes sobre-expresados en funciones relacionadas con la regulación de la transcripción, mientras que en los genes sub-expresados fueron más abundantes los relacionados con la respuesta inmune.

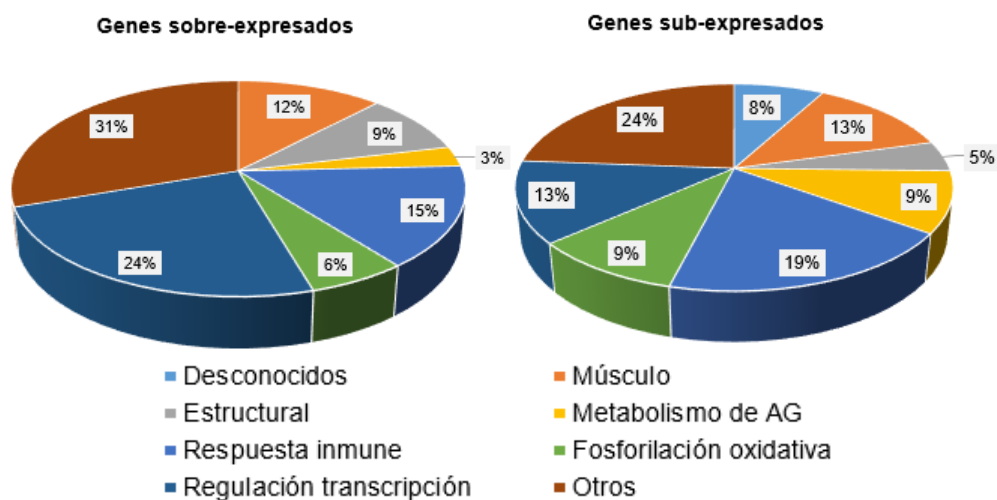


Figura 11. Clasificación de genes expresados diferencialmente en los camarones del tratamiento 'canola' respecto a los tratamientos 'sardina', 'sardina + salmón', por su función biológica.

En las Tablas XVIII y XIX se muestran los nombres de los genes sobre-expresados y sub-expresados diferencialmente respecto a los tratamientos con aceite de pescado, en las cuales se puede observar que hubo más genes reprimidos en el tratamiento 'canola' respecto a los tratamientos con aceite de pescado como los genes asociados al desarrollo y contracción del músculo, al metabolismo de lípidos y en la prevención del daño oxidativo, como la enzima antioxidante peroxiredoxin.

Respecto a los genes sobre-expresados diferencialmente en el tratamiento 'canola', se identificó un menor número de genes asociados a las funciones biológicas mencionadas anteriormente, destacando los genes relacionados al desarrollo muscular y genes participantes en la fosforilación oxidativa como succinate dehydrogenase, cytochrome c1, NADH dehydrogenase y a la fosforilación oxidativa como la ATP Synthase.

Tabla XVIII. Genes sobre-expresados diferencialmente en los tratamientos 'canola' respecto a los tratamientos con aceite de pescado.

ID_Gen	Gen	Nombre
<i>Metabolismo de lípidos</i>		
THIL_HUMAN	ACAT1	acetyl CoA acetyltransferase
<i>Músculo</i>		
BIN1_RAT	Bin1	myc box dependent interacting protein 1
OBSCN_DROME	Unc-89	obscurin
ACT1_DICD	act1	actin
MYSA_DROME	Mhc	myosin heavy chain
<i>Estrés o daño oxidativo</i>		
SODM_HUMAN	SOD2	superoxide dismutase [Mn]
<i>Fosforilación oxidativa</i>		
C560_HUMAN	SDHC	succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit
ATP5L_HUMAN	ATP5MG	ATP synthase subunit g
COX41_HUMAN	COX411	cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1

Tabla XIX. Genes sub-expresados diferencialmente en los tratamientos 'canola', respecto a los tratamientos con aceite de pescado

ID_Gen	Gen	Nombre
<i>Metabolismo de lípidos</i>		
ADHX_HUMAN	ADH5	alcohol dehydrogenase class 3
LIPT_HUMAN	LIP1	lipoyltransferase 1
ACSL4_HUMAN	ACSL4	long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4
THIM_HUMAN	ACAA2	ketoacyl CoA thiolase
SYEP_HUMAN	EPRS	bifunctional glutamate/proline tRNA ligase
HCDH_HUMAN	HADH	hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase
<i>Músculo</i>		
TPM1_HUMAN	TPM1	tropomyosin
MYSA_DROME	Mhc	myosin heavy chain
TITIN_HUMAN	TTN	titin
ACT2_MOLOC	N/A	actin
ACT5_ARATH	ACT5	actin 5
UNC89_CAEEL	unc-89	muscle M line assembly protein unc 89
CATL1_HUMAN	CATSL	cathepsin L
<i>Estrés o daño oxidativo</i>		
PRDX1	PRDX1_ HUMAN	peroxiredoxin 1
PXL2A	PXL2A_ HUMAN	peroxiredoxin-like 2A
msrAB	MSRAB_ HELP	peptide methionine sulfoxide reductase
TRX2	TRX2_YE AST	thioredoxin 2
<i>Fosforilación oxidativa</i>		
NDUA9_HUMAN	NDUFA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9
AT5F1_DROME	ATPsynB	ATP synthase subunit b
CY1_HUMAN	CYC1	cytochrome c1
NDUS4_HUMAN	NDUFS4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron sulfur protein 4
ATPO_HUMAN	ATP5PO	ATP synthase subunit O

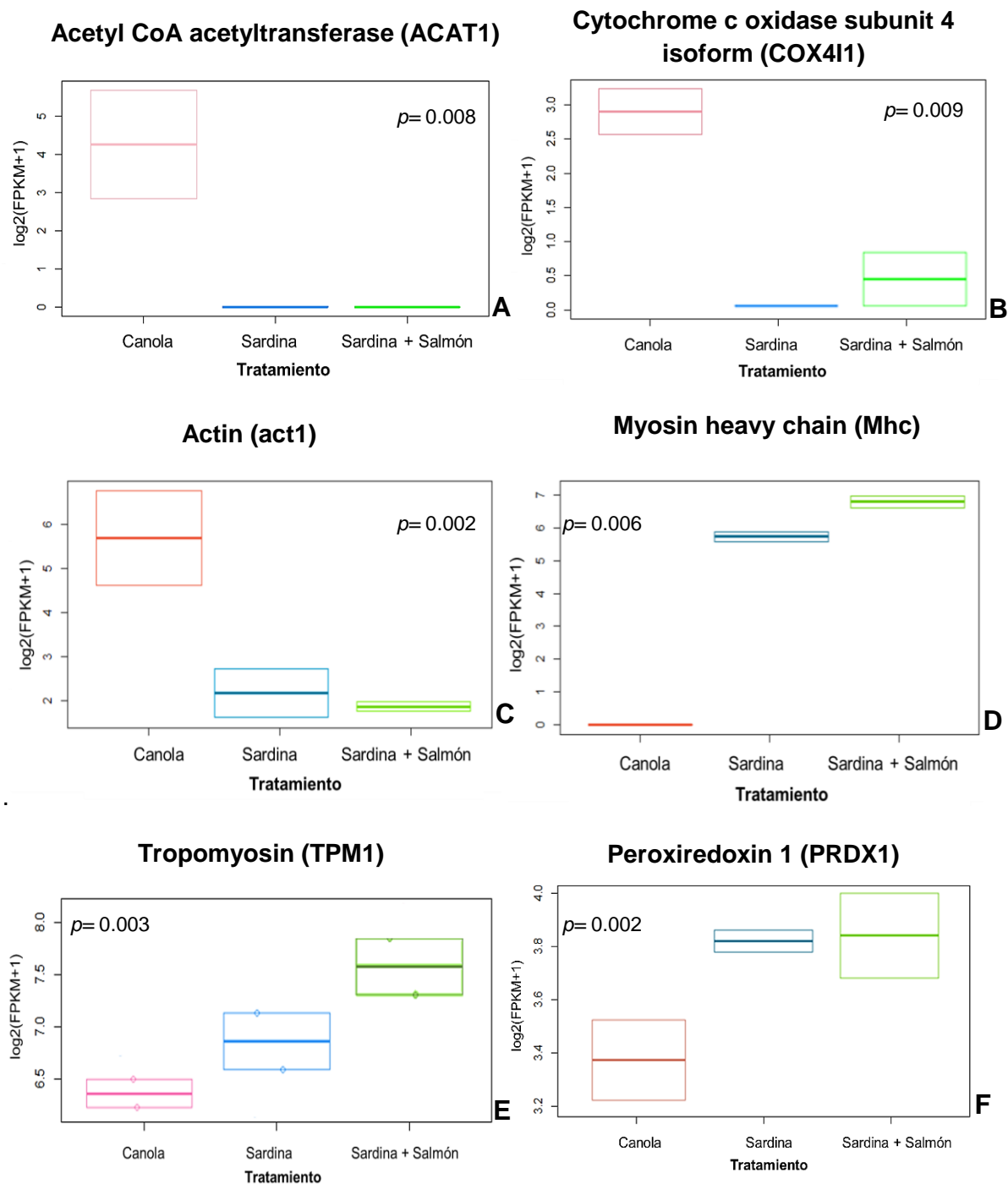


Figura 12. Distribución de FPKM (fragments per kilobase million) de genes expresados diferencialmente en los camarones alimentados con los diferentes tratamientos.

8. DISCUSIÓN

8.1 Rendimiento productivo de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas

Los resultados del rendimiento productivo de este experimento de alimentación indican que la sustitución de aceite de pescado por aceite de canola afecta negativamente los parámetros de crecimiento de *P. vannamei*, observando valores similares a los de otros estudios de reemplazo de aceite de pescado con aceites vegetales en la misma especie de estudio (Lim *et al.*, 1997; González-Félix *et al.*, 2002b; 2003; Zhou *et al.*, 2007). El porcentaje de lípidos de los alimentos se ubicó dentro del rango óptimo recomendado para la dieta para camarones peneidos (6-10%) de acuerdo con la FAO, (2018), por lo que las diferencias en crecimiento de los camarones se le podría atribuir a la calidad de los lípidos, que fue la única variable entre los tratamientos.

En este estudio, los camarones alimentados con la mezcla de aceite de sardina y aceite de salmón mostraron un crecimiento superior comparado con los camarones alimentados con aceite de canola, principalmente atribuido al aporte de EPA (7.6 %) del aceite de pescado en el alimento, siendo estos dos ácidos grasos esenciales para el camarón. Los camarones del tratamiento 'sardina + salmón' mostraron el menor FCA (1.3), siendo el principal indicador de la eficiencia de la producción acuícola que determina el desempeño económico en el cultivo de camarón (Wyban *et al.*, 1987) y que para camarones cultivados el promedio general del FCA es de 1.7 (Martínez-Córdova *et al.*, 2014).

Los resultados de esta tesis concuerdan con los de Lim *et al.* (1997) y González-Félix *et al.* (2002b), donde ambos utilizaron aceite de pescado menhaden (*Brevoortia tyrannus*) y este presentó el mejor valor nutricional (HUFA n-3) comparado con aceites vegetales de coco, cártamo, maíz, soja, linaza y maíz. De acuerdo con Orban *et al.* (2006), los altos niveles de PUFA n-3 en los aceites marinos, son los principales responsables de los efectos benéficos para la salud.

Se observó que el alimento con aceite de canola fue el menos consumido ($P < 0.05$), asociado a la falta de aceite de pescado que funciona como atrayente en las dietas para camarón, por lo que de acuerdo con Cruz Suárez *et al.* (2006) y Turchini y Mailer (2011), es importante considerar que un buen sustituto del aceite de pescado en los alimentos acuícolas, debe ser una fuente de energía apetecible y altamente digerible para asegurar su óptimo consumo y garantizar la eficiencia alimenticia, evitando cambios perjudiciales en los ácidos grasos de los tejidos del organismo.

En este experimento, los camarones del tratamiento 'canola' presentaron una menor proporción de EPA y DHA en la fracción polar en comparación con los camarones alimentados con aceites de pescado, por lo que es posible que una mayor duración de experimentación podría generar una deficiencia de estos ácidos grasos con mayor afectación a la tasa de crecimiento y repercusiones en la supervivencia.

8.2 Composición de ácidos grasos de *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas

El uso de aceites marinos y aceite vegetal en el alimento de camarón modificó el perfil de ácidos grasos en el músculo de *P. vannamei* (Tablas XII, XIII, XIV y XV) después de 28 días de alimentación. Se observaron contenidos estadísticamente superiores de PUFA y HUFA n-3 (Tabla XIV) en las fracciones polares, mientras que en las fracciones neutras hubo poca recuperación de AG. En estas fracciones polares del músculo de camarón de los tratamientos 'sardina' y 'sardina + salmón', se encontraron proporciones de HUFA n-3 significativamente más altas que en las fracciones de músculo de los camarones alimentados con aceite de canola, lo que indica que los perfiles de ácidos grasos en el alimento se reflejaron en gran medida en la composición de ácidos grasos del músculo.

Los resultados de esta investigación concuerdan con los obtenidos de otros ensayos de alimentación para *P. vannamei* (González-Félix *et al.*, 2002a; 2002b;

2003; Deering *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1997; Ju *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2019) donde el perfil lipídico fue modulado cuantitativamente a través de la formulación de alimentos con altos niveles de PUFA n-3, utilizando como principal fuente de lípidos los aceites de pescado, comparándolos con el uso de aceites de menor calidad (deficientes en HUFA n-3) como aceites vegetales y grasas.

El contenido de PUFA 18C como el ácido oleico (18:1n-9), 18:2n-6 (LA), 18:3n-3 (ALA) en el alimento y músculo de camarón del tratamiento 'canola' fue mayor comparado con los otros dos tratamientos con aceite de origen marino, como era de esperarse debido a la contribución del aceite de origen vegetal. Lim *et al.* (1997), González-Félix *et al.* (2002), y Zhou *et al.*, (2007) observaron resultados similares al comparar diferentes aceites vegetales y grasas deficientes en HUFA con aceite de pescado (menhaden).

A pesar de que se ha destacado la inclusión de valores superiores de AG de la familia n-3 respecto a los de la familia n-6 para el camarón *P. vannamei* (Kayama *et al.*, 1980), Koskela *et al.* (1992) menciona que los eicosanoides derivados de AG n-6 como el 20:4n-6 (ARA), presente en mayor proporción en los tratamientos con aceite de pescado, podrían estar involucrados en el proceso de muda de los crustáceos y, por lo tanto, influir también en el crecimiento.

Las dietas utilizadas en la presente investigación se formularon con 220 g kg⁻¹ de harina de pescado, lo que explica la pequeña cantidad, pero no ausente, de EPA (2.07%) y DHA (2.28%) en el alimento del tratamiento 'canola'. Estos ácidos grasos resultaron en niveles ligeramente más altos en los lípidos de los camarones que en las dietas comparados en base húmeda, particularmente en los lípidos polares, lo que podría indicar ya sea niveles bajos de elongación y desaturación de la cadena de forma limitada, como se ha observado en otros estudios (Kayama *et al.* 1980; Chen *et al.*, 2014; 2015a) o de bioacumulación selectiva o uso disminuido. Además, tratamiento 'canola' presentó mayor contenido de ALA (18:3n-3), sin embargo de acuerdo con lo observado por

Merican y Shim (1996) en *P. monodon*, el alto contenido de ALA no se cubre la deficiencia de DHA, y tampoco puede considerarse como un precursor de EPA y DHA al representar un papel tan importante para *P. vannamei*, por lo que es importante la inclusión de ambos ácidos grasos en el alimento para camarón.

En los resultados del análisis transcripcional (Tabla XVII) no se identificaron genes relacionados con biosíntesis de ácidos grasos de 18 carbonos, por lo que una mayor deposición de EPA y DHA no está necesariamente relacionada con elongación y/o desaturación, sino probablemente con una acumulación selectiva como se ha visto otros estudios (Tocher, 2003, 2015; Glencross, 2009; Glencross y Rutherford, 2010, Aráujo *et al.*, 2019) y con el uso preferente de ácidos grasos de cadena corta en el metabolismo energético (Deering *et al.*, 1997; Ju *et al.*, 2012).

8.3 Expresión diferencial en *P. vannamei* alimentado con diferentes fuentes lipídicas

En las librerías construidas a partir de ARN extraído de músculo de camarón, se identificaron genes expresados diferencialmente que pudieron clasificarse de acuerdo a su homología con secuencias previamente reportadas. Las muestras del músculo de camarón fueron seleccionadas para la identificación de genes expresados en respuesta al alimento con diferentes fuentes de lípidos, ya que la calidad de este órgano puede ser afectada por la formación de nutrientes específicos y la bioacumulación de nutrientes (Ezquerro-Brauer *et al.*, 2004), además de estar involucrado en el crecimiento del crustáceo (Zhang *et al.*, 2018).

Los tratamientos en los que se utilizó aceite de pescado ('sardina', 'sardina + salmón'), presentaron isoformas en común de los genes expresados diferencialmente con el tratamiento canola. Uno de estos genes fue myosin heavy chain (Mhc) que estuvo mayormente expresado en los camarones de mayor crecimiento (Fig. 12), y está relacionado con lo reportado por Koyama *et al.* (2012), donde mencionan que Mhc es considerada la principal proteína del

músculo esquelético. Estos resultados concuerdan con los de Kamimura *et al.* (2008) que observaron mayor expresión Mhc en camarones rosados (*Farfantepenaeus paulensis*) con mayor peso, por lo que lo consideraron como potencial marcador de expresión asociado al crecimiento.

En los camarones alimentados con aceite de pescado, que fueron los que presentaron la tasa de crecimiento más alta ($P < 0.05$), se observó una mayor expresión de tropomyosin (TPM1) (Fig. 16), el cual se ensambla a partir de la unión aleatoria de los filamentos de actin (act1) en las células musculares, que al disminuir la probabilidad de desprendimiento, conduce a un mayor crecimiento de la cadena y contribuye a la regulación de la contracción muscular (Schmidt *et al.*, 2015). También se encontraron sobre-expresados otros genes asociados al desarrollo muscular en los organismos que presentaron mayor crecimiento, como actin (N/A), actin 5 (ACT5), titin (TTN), muscle M line assembly protein unc 89 (unc-89) y cathepsin L (CATSL), los cuales fueron reportados por Nguyen *et al.* (2016) como marcadores asociados al crecimiento de *P. monodon*.

Se encontraron pocos genes sobre expresados diferencialmente en los camarones del tratamiento 'canola' respecto a los tratamientos donde se utilizó aceite de pescado, uno de estos fue la actin (act1) (Fig. 13), la cual de acuerdo con César y Yang (2007) tiene un rol importante en el crecimiento de músculo durante la etapa de premuda de *P. vannamei*. Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento son diferentes a los reportados por Zhang *et al.* (2018) y César y Yang (2007) para *P. vannamei*, debido a que la expresión de act1 fue en los camarones que tuvieron menor crecimiento.

En los camarones alimentados con aceite vegetal se encontró mayor expresión del gen que codifica para acetyl CoA acetyltransferase (Fig. 12). Este gen también fue reportado por Chen *et al.* (2015a) donde *P. vannamei* fue sometido a estrés crónico de baja salinidad. Estos autores indican que la enzima acetyl-CoA es un metabolito que puede influir indirectamente en la transferencia de iones o el metabolismo energético y promover "procesos compensatorios", al producir

energía a partir del metabolismo de lípidos y carbohidratos, indicando que durante periodos de baja ingesta de alimentos, como se observó en los camarones del tratamiento 'canola', la energía se obtiene de la descomposición de los ácidos grasos del tejido corporal en lugar de la glucosa.

En esta investigación se esperaba encontrar síntesis y/o elongación HUFA a partir de PUFA 18C mediante la expresión del gen FAS en los camarones alimentados con el aceite vegetal, como se ha observado en otros estudios de Chen *et al.* (2015ac) donde se utilizaron dietas deficientes en HUFA. Sin embargo, no se identificó la expresión de este gen en este estudio, probablemente debido a que la dieta presentó un aporte ~2% de EPA y DHA por la inclusión de la harina de pescado, y porque la duración experimento (28 días) fue corto para observar síntesis, elongación o desaturación de ácidos grasos en comparación con otros experimentos con duración de hasta ocho semanas (Chen *et al.*, 2015ac).

Se identificaron genes asociados al metabolismo de lípidos como el gen que codifica la enzima ketoacyl CoA thiolase, encargado de producir energía a partir de grasas, el cual estuvo sub-expresado en los camarones del tratamiento 'canola'. Este gen ha sido reportado por Chen *et al.* (2015a), como el responsable de catalizar el último paso de la vía de β -oxidación mitocondrial y de catalizar la condensación de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA, por lo que podría estar involucrado en la producción de cuerpos cetónicos, y por lo tanto funcionar directa o indirectamente en procesos compensatorios" y limitantes (Kiema, *et al.*, 2014).

Otros genes que estuvieron sub-expresados en los camarones alimentados con la dieta deficiente en HUFA fueron long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4, que de acuerdo con Xianhong Meng *et al.* (2019) está relacionado con la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, y genes relevantes para la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga como ketoacyl CoA thiolase, alcohol dehydrogenase class 3 (Xixuan H. Collins *et al.*, 2005) y bifunctional glutamate/proline tRNA ligase (EPRS) (Arif *et al.*, 2017). Estos resultados podrían

indicar que *P. vannamei* prefiere usar ácidos grasos de cadena más corta para la aportación energética y que retiene selectivamente los ácidos grasos insaturados de cadena más larga. Estos genes también fueron reportados por Chen *et al.* (2015ab) para la misma especie, en respuesta al estrés crónico a baja salinidad (3 ups), en camarones alimentados con diferentes fuentes de lípidos, y en *P. chinensis* en respuesta al estrés por temperatura baja (4°C) (Xianhong Meng *et al.*, 2019).

Algunos genes asociados a la respuesta inmune que codifican las proteínas peroxiredoxin 1 y peroxiredoxin-like 2A (prx) estuvieron sobre-expresados en los tratamientos en los que se utilizó aceite de pescado. Estas proteínas pertenecen a la familia de antioxidantes que protegen a los organismos aeróbicos contra el daño oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bacano Maningas *et al.*, 2008), y han sido reportadas por Lihua Qiu *et al.* (2010) en camarón *P. monodon* y por Digang Zeng *et al.* (2015) en hemocitos de *P. vannamei* después de un reto de infección viral. La expresión de esos genes también fue similar en el estudio de Pérez-Sánchez *et al.* (2011) en células de riñón de dorada *Sparus aurata*, donde el gen PRDX2 estuvo mayormente expresado en peces alimentados con una dieta que contenía aceite de pescado en comparación con peces alimentados con una dieta que incluía aceite vegetal (deficiente en ácidos grasos esenciales). De acuerdo con Kumar *et al.* (2018), los PUFA son objetivos principales para las especies reactivas de oxígeno por lo que los niveles elevados de HUFA por el aporte de aceite de sardina y salmón en este estudio, permitiría una mayor protección ante un posible riesgo de estrés oxidativo en los camarones.

Los resultados de este estudio mostraron que en los camarones alimentados con aceite de canola, genes como succinate dehydrogenase cytochrome b560, ATP Synthase y cytochrome c oxidase (Fig. 12) estuvieron sobre-expresados, mientras que NADH dehydrogenase, ATP Synthase, cytochrome c1, thioredoxin 2 estuvieron reprimidos. Todos estos genes están relacionados con la fosforilación oxidativa en la cadena transportadora de electrones, y se expresaron de manera similar en hemocitos de *P. vannamei* en respuesta a lipopolisacáridos (LPS)

(Zhang *et al.*, 2018). De acuerdo con estos autores antes mencionados, ante una respuesta al estrés oxidativo, los macrófagos podrían reprogramar la ruta del metabolismo, que incluye una tasa de glucólisis regulada por aumento y un nivel reducido de fosforilación oxidativa, es decir, se presenta mayor oxidación de carbohidratos que de lípidos para obtención de energía en los camarones alimentados con aceite de canola.

Los camarones cultivados están sujetos a factores (tanto bióticos como abióticos) que pueden afectar su producción, crecimiento y salud como resultado de la generación de estrés oxidativo (Kutter *et al.*, 2014). El daño oxidativo por ROS afecta varios procesos fisiológicos, incluida la regulación de la señalización celular, la expresión génica y la defensa antimicrobiana provocada por el sistema inmune (Bacano-Maningas *et al.*, 2008) como se pudo observar en los resultados de expresión diferencial del presente estudio. Contrario con los datos de Ruxton *et al.* (2007) y Mercier *et al.* (2009), la inclusión de HUFA n-3 en las dietas experimentales no previno procesos de inflamación, por lo que no se contrarrestó el efecto negativo del manejo del estrés sobre los camarones.

De acuerdo con los datos obtenidos de expresión diferencial en esta investigación, se muestra una mayor incidencia del estrés oxidativo en el músculo de camarones alimentados con las dietas con aceite de pescado, a pesar de la adición de antioxidantes (0.3 g kg^{-1} BHT). De acuerdo con Kjær *et al.* (2008), es importante proteger los alimentos ricos en HUFA n-3 con antioxidantes adecuados y el almacenamiento adecuado para minimizar la peroxidación de los AG antes y después de la alimentación de los organismos debido a que los PUFA y HUFA son los objetivos principales para las ROS (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

9. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que la sustitución de aceite de pescado (sardina y salmón) por aceite de canola, afecta negativamente el rendimiento productivo del camarón *P. vannamei* juvenil en un periodo de 28 días, así como la composición de ácidos grasos del músculo sin presentar síntesis *de novo* de HUFA como EPA y DHA. La calidad de los aceites utilizados en la dieta influye de manera significativa en la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos, respuesta inmune, fosforilación oxidativa, proteínas estructurales, marcadores asociados al desarrollo, contracción muscular y crecimiento.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda alargar el tiempo de alimentación experimental (ocho semanas), así como considerar el aporte lipídico de los ingredientes utilizados en el alimentos.

Es necesario ampliar el análisis transcripcional para conocer las rutas metabólicas en las que se involucran los genes encontrados en esta investigación.

11. LITERATURA CITADA

- Amaya, E. A., D. A. Davis, D. B. Rouse. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*. 262(2-4), 393–401.
- Arif, A., F. Terenzi, A. A. Potdar, J. Jia, J. Sacks, A. China, P. L. Fox. 2017. EPRS is a critical mTORC1–S6K1 effector that influences adiposity in mice. *Nature*, 7641: 357–361.
- Arzola-González J., L. Flores-Campaña, A. Izabal-Ceja, Y. Gutiérrez-Rubio. 2008. Crecimiento de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en un estanque rústico a baja salinidad. *AquaTIC*, 28: 8–15.
- Bell, M. V., D. R. Tocher. 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. *Lipids in Aquatic Ecosystems*, 211–236. Springer, Nueva York, NY.
- Berg, J. M, J. L. Tymoczko, L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5^{ta} edición. New York: W H Freeman; 2002. Sección 22.4, Fatty Acids Are Synthesized and Degraded by Different Pathways. Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22554/>
- Bottino, N. R., J. Gennity, M. L. Lilly, E. Simmons, G. Finne. 1980. Seasonal and nutritional effects on the fatty acids of three species of shrimp, *Penaeus setiferus*, *P. aztecus* and *P. duorarum*. *Rev Aquac*. 19 (2): 139–148.
- Canseco, Lenin. 2015. Desarrollo de Alimentos Formulados Para Especies Acuícolas. *Rev. mex. agroecosistemas* 2(1): 40–48.
- Carrillo, O., F. Vega-Villasante, H. Nolasco, N. Gallardo. 2000. Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. A. Olvera-Novoa, R. Civera-Cerecedo (eds.). *Avances de Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19–22 Noviembre 2000. Mérida, Yucatán, México.

- Cesar, J. R. O., J. Yang. 2007. Expression patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, α -actin and β -actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. Mol. Reprod. Dev. 74(5): 554–559.
- Chamberlain, D. G., J.J. Choung. 1995. The importance of rate of ruminal fermentation of energy sources in diets for dairy cows. P.C. Garnsworthy, D.J.A. Cole (eds), Recent Advances in Animal Nutrition, Nottingham University Press, Nottingham, UK. 3–27
- Chandhini, S., V. J. Rejish Kumar. 2018. Transcriptomics in aquaculture: current status and applications. Brief Funct. Genomics. 1–18.
- Chen, H. Y., R. H. Tsai. 1986. The dietary effectiveness of Artemia nauplii and microencapsulated foods for postlarval *Penaeus monodon*. En: Research and Development of Aquatic Animal Feed in Taiwan. (1), 73–39. (Chuang, J. L., Shiau, S. Y., Eds.), F. S. T. Monograph Series No. 5, Fisheries Society of Taiwan, Taipei.
- Chen, K. E. Li, Z. Xu, T. Li, C. Xu, J. G. Qin. 2015a. Comparative Transcriptome Analysis in the Hepatopancreas Tissue of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Fed Different Lipid Sources at Low Salinity. PLoS ONE 10(12): e0144889
- Chen, K., E. Li, C. Xu, X. Wang, H. Lin, J. G. Qin, L. Chen. 2015c. Evaluation of different lipid sources in diet of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. Aquacult. Rep. 2: 163–168.
- Chen, K., E. Li, L. Gan, X. Wang, C. Xu, H. Lin, L. Chen. 2014. Growth and Lipid Metabolism of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* at Different Salinities. J. shellfish res, 33(3): 825–832.
- Chen, K., E. Li, T. Li, C. Xu, X. Wang, H. Lin. 2015b. Transcriptome and Molecular Pathway Analysis of the Hepatopancreas in the Pacific White Shrimp

Litopenaeus vannamei under Chronic Low-Salinity Stress. PLoS ONE 10(7): e0131503.

- Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical biochemistry. 162 (1): 156–159.
- Clavero-Salas, A., R. Sotelo-Mundo, T. Gollas-Galván, J. Hernández-López, A. Peregrino-Uriarte, A. Muhlia-Almazán, G. Yepiz-Plascencia. 2007. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Penaeus vannamei* infected with White spot syndrome virus. Fish and Shellfish immunol. 23 (2): 459–472.
- Collins, A., B. Russell, A. Walls, T. Hoang. 2005. Inland prawn farming studies into the potential for inland marine prawn farming in Queensland. Queensland Department of Primary Industries and Fisheries (DPI&F). Australia. 79.
- CONAPESCA. (30 de Diciembre de 2018). Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Obtenido de <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/155434>
- Cruz-Suárez, L. E, D. Ricque-Marie, J. A. Martínez-Vega, P. Wesche-Ebeling. 1993. Evaluación de dos comidas derivadas de camarones como fuentes de proteínas en las dietas para *Penaeus vannamei*. Acuicultura, 115 (1-2), 53-62.
- Cruz-Suárez, L. E., P. Ruiz-Díaz, E. Cota-Cerecer, M. G. Nieto-Lopez, C. Guajardo-Barbosa, M. Tapia-Salazar, D. Villarreal-Cavazos, D. Ricque-Marie. 2006. Revisión sobre Algunas Características Físicas y Control de Calidad de Alimentos Comerciales para Camarón en México. Eds: Cruz-Suarez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Nieto-López, D. Villarreal-Cavazos, A. Puello-Cruz, A. García-Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15–17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

- Deering, M. J., D. R. Fielder, D. R. Hewitt. 1997. Growth and fatty acid composition of juvenile leader prawns, *Penaeus monodon*, fed different lipids. *Aquaculture*, 151: 131–141.
- Ezquerro-Brauer, J.M., L. Bringas-Alvarado, A. Burgos-Hernández, O. Rouzaud-Sández. 2004. Control de la Composición Química y Atributo de Calidad de Camarones Cultivados. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G, Villareal, D., Scholz, U. y González, M (eds). 2004. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16–19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- FAO. 1989. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB492S/AB492S00.htm>
- FAO. 2009. *Penaeus vannamei*. In Cultured aquatic species fact sheets. Obtenido de http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/aquaculture/l1129m/file/es/es_whitelegshrimp.htm
- FAO. 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter, V. H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca, Pacífico centro-oriental. Plantas e invertebrados, I: 417–564.
- Folch, J., M. Lees, G. H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.
- Gámez-Meza, N., I. Higuera-Ciapara, A. M. Calderon de la Barca, L. Vázquez-Moreno, J. Noriega-Rodríguez, O. Angulo-Guerrero. 1999. Seasonal variation in the fatty acid composition and quality of sardine oil from *sardinops sagax caeruleus* of the gulf of California. *Lipids* 34, 639–642.

- Glencross, B. D., D. M. Smith. 1999. The Dietary Linoleic and Linolenic Fatty Acids Requirements of the Prawn *Penaeus Monodon*. *Aquacult. Nutr.* 5(1): 53–63.
- Godínez-Siordia, D., M. Chávez-Sánchez, S. Gómez-Jiménez. 2011. Acuicultura Epicontinental del Camarón Blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Trop. Subtrop. Agroecosystems*, 14 (1): 55–62.
- Gong, H., A. L. Lawrence, D. M. Gatlin, D. H. Jiang, F. Zhang. 2001. Comparison of different types and levels of commercial soybean lecithin supplemented in semipurified diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquac. Nutr.* 7: 11–17.
- González-Félix, M. L., A. L. Lawrence, D. M. Gatlin, M. Perez-Velazquez. 2002a. Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. *Aquac. Res.* (205): 325–343.
- González-Félix, M. L., A. L. Lawrence, D. M. Gatlin, M. Perez-Velazquez. 2003. Nutritional Evaluation of Fatty Acids for the Open Thelycum Shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of Dietary Linoleic and Linolenic Acids at Different Concentrations and Ratios on Juvenile Shrimp Growth, Survival and Fatty Acid Composition. *Aquacul. Nutr.* 9(2): 105–13.
- González-Félix, M. L., D. M. Gatlin, A. Lawrence, M. Perez-Velazquez. 2002b. Effect of Various Dietary Lipid Levels on Quantitative Essential Fatty Acid Requirements of Juvenile Pacific White Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *J. of World Aquacul. Soc.* 33(3): 330–40.
- González-Félix, M. L., F. S. Da Silva, D. A. Davis, T. M. Samocha, T. C. Morris, J. S. Wilkenfeld, M. Perez-Velazquez. 2010. Replacement of fish oil in plant based diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 309(1-4): 152–158.
- Hernández-Gurrola, J. A. 2016. Caracterización de la calidad de agua en un sistema intensivo de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, en

- condiciones de alta salinidad con recambio limitado. Tesis (Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales). La Paz, B.C.S, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 4–7p.
- Holme, M. H., P.C. Southgate, C. Zeng. 2007. Survival, development and growth response of mud crab, *Scylla serrata*, megalopae fed semi-purified diets containing various fish oil:corn oil ratios. *Aquaculture*, 269(1-4): 427–435.
- Hunt, M. C., S. Nousiainen, M. Huttunen, K. Orii, L. Svensson, S. Alexson. 1999. Peroxisome Proliferator-induced Long Chain Acyl-CoA Thioesterases Comprise a Highly Conserved Novel Multi-gene Family Involved in Lipid Metabolism. *J. Biol. Chem.*, 274(48), 34317–34326.
- INAPESCA. (16 de Marzo de 2018). Instituto Nacional de Pesca. Obtenido de <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-camaron-blanco-del-pacifico>
- Ju, Z.Y., F. Castile, D. Deng, W. G. Dominy, A. L. Lawrence, I. P. Forster. 2012. Effects of replacing fish oil with stearine as main lipid source in diet on growth and survival of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquac. Res.*, 43: 1528–1535.
- Kamimura M. T., K. M. Meier, R. O. Cavalli, J. Laurino, R. Maggioni, L. F. Marins. 2008. Characterization of growth-related genes in the south-western Atlantic pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) through a modified DDRT-PCR protocol. *J. Aquac. Res. Dev.* 39: 200– 204.
- Kanazawa, A. 2001. Sterols in marine invertebrates. *Asian Fish. Sci.*, 67(6): 997–1007.
- Kanazawa, A., S. Teshima, K. Ono, K. Chalayondeja. 1979b. Biosynthesis of Fatty Acids from Acetate in the Prawns, *Penaeus monodon* and *Penaeus merguensis*. *Memoirs of Faculty of Fisheries, Kagoshima University.* 28:21–26.

- Kanazawa, A., S. Teshima, M. Endo. 1979a. Requirements of prawn, *Penaeus japonicus*, for essential fatty acids. Memoirs of Faculty of Fisheries, Kagoshima University. 28: 27–33.
- Kayama, M., M. Hirata, A. Kanazawa, S. Tokiwa, M. Saito. 1980. Essential fatty acids in the diet of prawn-III. Lipid metabolism and fatty acid composition. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 46: 483–488.
- Kiema, T., R. K. Harijan, M. Strozyk, T. Fukao, S. E. Alexson, R. K. Wierenga. 2014. The crystal structure of human mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase (T1): insight into the reaction mechanism of its thiolase and thioesterase activities. Acta Cryst. 70: 3212–3225.
- Kjær, M. T., M. Todorčević, B. E. Torstensen, A. Vegusda, I. B. Ruyter. 2008. Dietary n-3 HUFA Affects Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Capacity and Susceptibility to Oxidative Stress in Atlantic Salmon. Lipids. 43(9): 813–827.
- Kontara, E. K. M., P. Coutteau, P. Sorgeloos. 1997. Effect of dietary phospholipid on requirements for and incorporation of n-3 highly unsaturated fatty acids in postlarval *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture, 158(3-4): 305–320.
- Koskela, R. W., J. G. Greenwood, P. C. Rothlisberg. 1992. The influence of prostaglandin E2 and the steroid hormones, 17 α -hydroxyprogesterone and 17 β -estradiol on moulting and ovarian development in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell, 1879 (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol. 101(2): 295–299.
- Koyama, H., D. B. Akolkar, S. Piyapattanakorn, S. Watabe. 2012. Cloning, Expression, and Localization of Two Types of Fast Skeletal Myosin Heavy Chain Genes From Black Tiger and Pacific White Shrimps. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 317(10): 608–21.
- Kumar, V., H. M. Habte-Tsion, K. M. Allen, B. A. Bowman, K. R. Thompson, E. El-Haroun, K. Filer, J. H. Tidwell. 2018. Replacement of fish oil with *Schizochytrium* meal and its impacts on the growth and lipid metabolism of

- Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquacult. Nutr.* 24(6): 769–1781.
- Kutter, M. T., L. A. Romano, J. Ventura-Lim, M. B. Tesserad, J. M. Monserrat. 2014. Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic organisms. *Comp. Biochem. Phys. C.* 162: 70–76.
- Lim, C., Ako H., C. L. Brown, K Hahn. 1997. Growth Response and Fatty Acid Composition of Juvenile *Penaeus Vannamei* Fed Different Sources of Dietary Lipid. *Aquaculture*, 151: 143–53.
- Lin, Z., M. Hao, D. Zhu, S. Li, X. Wen. 2017. Molecular cloning, mRNA expression and nutritional regulation of a $\Delta 6$ fatty acyl desaturase-like gene of mud crab, *Scylla paramamosain*. *Comp Biochem Phys B.* 208-209: 29–37.
- Martin, B. J. 1980. Growth and fatty acids of *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda) given compounded diets with different proportions of linoleic and linolenic acids. *Aquaculture*, 19 (4): 325–337.
- Martínez-Álvarez, R., A. E. Morales, A. Sanz. 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 15 (1–2): 75–88.
- Martínez-Córdova, L. R., M. Martínez-Porchas, E. Cortés-Jacinto. 2014. Alimentos y estrategias de alimentación para una acuicultura sustentable. AGT Editor, S.A. Primera edición. México, D.F. 163p.
- Mathieu-Resuge, M., E. Kraffe, F. Le Grand, A. Boens, A. Bideau, S. E. Lluch-Cota, I. S. Racotta, G. Schaal. 2019. Trophic ecology of suspension-feeding bivalves inhabiting a northeastern Pacific coastal lagoon: Comparison of different biomarkers. *Mar Environ Res.* 145: 155–163.
- Mercier, L., I. S. Racotta, Yepiz-Plascencia G., Muhlia-Almazán A., R. Civera, M. F. Quiñones-Arreola, M. Wille, P. Sorgeloos, E. Palacios. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus*

- vannamei* (Boone) exposed to handling stress. *Aquacult. Res.* 40 (16): 1849–1863.
- Merican, Z.O., K. F. Shim. 1996. Qualitative requirements of essential fatty acids for juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 147: 275–291.
- Molina-Poveda, C., H. Villareal Colmenares. 2008. Estrategias de alimentación en la etapa de engorda del camarón (Primera ed.). La Paz, Baja California Sur: CIBNOR, S.A.; CYTED; PRONACA. Obtenido de <https://www.cibnor.gob.mx/images/stories/biohelis/pdfs/Estrategias-de-alimentacion-en-la-etapa-de-engorda-del-camaron.pdf>
- Mutch, D. M., W. Wahli, G. Williamson. 2005. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J.* 19(12): 1602–1616.
- National Center for Biotechnology Information. Pub Chem Database. CID=5283157, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/20-Hydroxyeicosatetraenoic-acid> (accessed on Nov. 7, 2019).
- Nguyen, C., T. G. Nguyen, L. V. Nguyen, H. Q. Pham, T. H. Nguyen, H. T. Pham, H. T. Nguyen, T. T. Ha, H. T. Vu, D. D. Nguye, N. T. T. Nguyen, N. H. Nguyen, D. V. Quyen, H. H. Chu, K. D. Dinh. 2016. *De novo* assembly and transcriptome characterization of major growth-related genes in various tissues of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 464: 545–553.
- Nolasco-Alzaga, H. R. 2016. Estimación de la heredabilidad de ácidos grasos en *Litopenaeus vannamei*. Tesis (Maestría en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales). La Paz, B.C.S, México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 13p.
- O'Connor, J., L. Gilbert. 1968. Aspects of Lipid Metabolism in Crustaceans, *Am. Zool.* 8 (3): 529–539
- Orban, E., T. Navigato, G. D. Lena, I. Casini, A. Marzetti. 2003. Differentiation in the Lipid Quality of Wild and Farmed Seabass (*Dicentrarchus labrax*) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *J. Food Sci.* 68: 128–132.

- Ouraji, H., B. Shabanpour, A. Kenari, A. Shabani, S. Nezami, M. Sudagar, S. Faghani. 2009. Total lipid, fatty acid composition and lipid oxidation of Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) fed diets containing different lipid sources. *J. Sci. Food Agr.* 89(6): 993–997.
- Paoloni-Giacobino, A., R. Grimble, C. Pichard. 2003. Genetics and nutrition. *Clin. Nutr.* 22(5): 429–435.
- Peña-Rodríguez, A. 2011. Uso potencial de la macroalga verde *Ulva clathrata* en el cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis (Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología). Monterrey, Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. 36p.
- Parrish, C. (28 de marzo de 2018). International Aquafeed. Recuperado el Enero de 2019, de <http://www.aquafeed.co/acidos-grasos-esenciales/>
- Perteau, M., K. Kim, G. M. Perteau, J. T. Leek, S. L. Salzberg. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat. Protoc.* 11(9): 1650–1667.
- Powell, D., W. Knibb, C. Remilton, A. Elizur. 2015. *De-novo* transcriptome analysis of the banana shrimp (*Fenneropenaeus merguensis*) and identification of genes associated with reproduction and development. *Mar. Genom* 22: 71–78.
- Read, G. H. L. 1981. The response of *Penaeus indicus* (Crustacea: Penaeidea) to purified and compounded diets of varying fatty acid composition. *Aquaculture*, 24: 245–256.
- Ricker, W. E. 1975. Cálculo e interpretación de estadísticas biológicas de poblaciones de peces (Vol. 191, pp. 1-382). Ottawa: Departamento de Medio Ambiente, Pesca y Servicio Marino.
- Romano, N., C. Zeng, N. M. Noordin, W. K. Ng. 2012. Improving the survival, growth and hemolymph ion maintenance of early juvenile blue swimmer

- crabs, *Portunus pelagicus*, at hypo- and hyper-osmotic conditions through dietary long chain PUFA supplementation. *Aquaculture*, 342-343: 24–30.
- Ruxton, C., S. Reed, M. Simpson, K. Millington. 2007. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 20(3): 275–285.
- Samocha, T. M., S. Patnaik, D. A. Davis, R. A. Bullis, C. L. Browdy. 2009. Use of commercial fermentation products as a highly unsaturated fatty acid source in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.* 41(7): 961–967.
- Samocha, T., D. A. David, I. P. Saound, K. DeBault. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 231(1-4), 197–203.
- Schmidt, W. M., W. Lehman, J. R. Moore. 2015. Direct observation of tropomyosin binding to actin filaments. *Cytoskeleton*, 72(6): 292–303.
- Sheen, S.S., S. W. Wu. 2003. Essential fatty acid requirements of juvenile mud crab, *Scylla serrata* (Forskål, 1775, Decapoda, Scyllaridae). *Crustaceana* 75: 1387–1401.
- Shewbart, K.L., W. L. Mies. 1973. Studies on nutritional requirements of brown shrimp - the effect of linolenic acid on growth of *Penaeus aztecus*. *Proc. World Maric. Soc.* 4: 227–287.
- Shiau, S. Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*, 164(1-4): 77–93.
- Shu-Chien, A. C., W.Y. Han, C. G. Carter, Q. P. Fitzgibbon, C. J. Simon, M. K. Kuah, T. Ventura. 2017. Effect of dietary lipid source on expression of lipid metabolism genes and tissue lipid profile in juvenile spiny lobster *Sagmariasus verreauxi*. *Aquaculture*, 479: 342–351.

- Suárez, C. 1996. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. *Avances en Nutrición Acuícola* III. 207–230.
- Suprayudi, M. A., T. Takeuchi, K. Hamasaki. 2004. Essential fatty acids for larval mud crab *Scylla serrata*: implications of lack of the ability to bioconvert C18 unsaturated fatty acids to highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 231(1–4): 403–416.
- Tacon, A. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. *Manual de Capacitación. Proyecto Aquila II. Documento de Campo No. 4.*
- Tocher, D. R. 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Rev. Fish. Sci.* 11(2): 107–184.
- Torres, J., S. Duran. 2015. Fosfolípidos: propiedades y efectos sobre la salud. *Nutr. Hosp.*, Madrid, 31 (1): 76-83. Obtenido de: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112015000100007&lng=es&nrm=iso>
- Turchini, G., R. J. Mailer. 2011. Rapeseed (canola) oil and other monounsaturated fatty acid-rich vegetable oils. En: Turchini, G. M., N. Wing-Keong, Tocher, D. R. (eds). *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*, CRC Press, Boca Raton, Flo. 161–208.
- Van Wyk, P., M. Davis-Hodgkins, C. R. Laramore, K. L. Main, J. Mountain, J. Scarpa. 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Ft. Pierce, FL: Harbor Branch Oceanographic Institution. Capítulo 7 – Nutrition and Feeding of *Litopenaeus vannamei*. 125–139.
- Wyban, J. A., C. S. Lee, V. T. Sato, J. N. Sweeney, W. K. Richards. 1987. Effect of stocking density on shrimp growth rates in manure-fertilized ponds. *Aquaculture*, 61(1): 23–32.
- Wyban, J. A., J. N. Sweeny. Shrimp health maintenance. En: *Intensive shrimp production technology*. The Oceanic Institute, Hawaii. 103–12.

- Xu, X., W. Ji, J. D. Castel, R. O'Dor. 1993. The nutritional value of dietary n-3 and n-6 fatty acids for the Chinese prawn (*Penaeus chinensis*). *Aquaculture*. 118(3–4): 277–285.
- Yang, L., J. Liu, M. Liu, M. Qian, M. Zhang, H. Hu. 2011. Identification of fatty acid synthase from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* and its specific expression profiles during white spot syndrome virus infection. *Fish Shellfish Immun.* 30(2): 744–749.
- Zhang, X., X. Zhang, J. Yuan, J. Du, F. Li, J. Xiang. 2018. Actin genes and their expression in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Mol Genet. Genomics*. 293(2): 479-493.
- Zhou, Q. C., C. C. Li, C. W. Liu, S. Y. Chi, Q. H. Yang. 2007. Effects of dietary lipid sources on growth and fatty acid composition of juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 13: 222–229.

12. ANEXO

Anexo A Limpieza de librerías

```
java -jar /home/Apps/trimmomatic/Trimmomatic-0.38/trimmomatic-0.38.jar PE -
phred33 libreria_fwd.fastq.gz libreria_reverse.fastq.gz libreria_fwd_paired.fq.gz
libreria_fwd_unpaired.fq.gz libreria_reverse_paired.fq.gz
libreria_reverse_unpaired.fq.gz ILLUMINACLIP:TrueSeq3-SE.fa:2:30:10
LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
```

Anexo B Estadística global del genoma de referencia

Scaffolds	4,683
Contigs	33,020
Contig N50	86,864
Contig L50	5,435
Longitud total (Mb ¹)	1663.58
GC ² (%)	37.1
Proteínas	33273
Genes	30,520

¹ Megabit, ² Guanina y Citosina.

Anexo C Indexado del genoma de referencia

```
/programas/hisat2/hisat2-build genoma_de_referencia.fna hst2_base
```

Anexo D Inspector del genoma indexado

```
programas/hisat2/hisat2-inspect -s /genoma_indexado/ht2_base
```

```
Fold, ASM378908v1 LVANScaffold_4305, whole genome shotgun sequence
5967
```

Num. SNPs: 0

Num. Splice Sites: 0

Num. Exons: 0

Anexo E Alineamiento de las librerías al genoma

```
programas/hisat2/hisat2 -p 8 --dta -x
```

```
/home/slopez/analisis/genoma_indexado/hst2_base -1 libreria_fwd_paired.fq.gz -2
libreria_reverse_paired.fq.gz -S muestra-1.sam
```

Anexo F Conversión de archivo .sam a .bam

```
samtools sort -@ 8 -o muestra-1.bam muestra-1.sam
```

Anexo G Ensamble y cuantificación de genes y transcritos expresados

```
/stringtie-1.3/stringtie -p 8 -G genoma_de_referencia.gtf -o muestra-1.gtf -l muestra-1.bam
```

Anexo H Combinación de todos los transcritos de todas las muestras

```
/stringtie-1.3/stringtie --merge -p 8 -G genoma_de_referencia.gtf -o stringtie_merged.gtf mergelist.txt
```

Anexo I Análisis de la comparación de los transcritos con la anotación de referencia

```
/programas/gffcompare-0.10.8/gffcompare -r anotacion_de_referencia.gtf -G -o merged stringtie_merged.gtf
```

Query mRNAs : 45903 in 32366 loci (39543 multi-exon transcripts)

(5467 multi-transcript loci, ~1.4 transcripts per locus)

Reference mRNAs : 39647 in 30248 loci (35166 multi-exon)

Super-loci w/ reference transcripts: 29114

	Sensitivity	Precision
Base level:	100.0	94.7
Exon level:	100.0	95.0
Intron level:	99.6	96.2
Intron chain level:	100.0	88.9
Transcript level:	100.0	86.4
Locus level:	100.0	92.3

Matching intron chains: 35166

Matching transcripts: 39647

Matching loci: 30248

Missed exons: 0/ 186177 (0.0%)

Novel exons: 6304/ 197223 (3.2%)

Missed introns: 581/ 154647 (0.4%)

Novel introns: 2195/ 159983 (1.4%)

Missed loci: 0/30248 (0.0%)

Novel loci: 2374/32366 (7.3%)

Total union super-loci across all input datasets: 32366

45903 out of 45903 consensus transcripts written in merged.annotated.gtf (0 discarded as redundant)

Anexo J Generación de archivos de abundancia

```
/stringtie-1.3/stringtie -p 8 -G stringtie_merged.gtf -o ballgown/muestra-1.gft
/muestra-1.bam -e -B
```

Anexo K Protocolo de análisis de expresión diferencial

R version 3.6.0 (2019-04-26) -- "Planting of a Tree"

Copyright (C) 2019 The R Foundation for Statistical Computing

Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

#Cargar librerías

```
library(ballgown)
```

```
library(RSkittleBrewer)
```

```
library(genefilter)
```

```
library(dplyr)
```

```
library(devtools)
```

#Preparar directorio

```
data_directory = system.file('C:/Users/Susej/Documents/ballgown', package =
'ballgown')
```

```
Data_directory
```

```
bg = ballgown(dataDir="C:/Users/Susej/Documents/ballgown", samplePattern =
"sample")
```

```
bg
```

```
save(bg, file='bg.rda')
```

```
structure(bg)$exon
```

```
structure(bg)$intron
```

```
structure(bg)$trans
```

```
transcript_fpkms = texpr(bg, 'FPKM')
```

```
transcript_cov = texpr(bg, 'cov')
```

```
whole_tx_table = texpr(bg, 'all')
```

```
exon_mcov = eexpr(bg, 'mcov')
```

```
junction_rcount = iexpr(bg)
```

```
whole_intron_table = iexpr(bg, 'all')
```

```

gene_expression = gexpr(bg)
write.csv(gene_expression, file= 'Document_gene_expression.csv')

# Expresión diferencial

exon_rcount_matrix = eexpr(bg)
exon_ucount_matrix = eexpr(bg, 'ucount')
exon_data_frame = eexpr(bg, 'all')
names(expr(bg))
class(expr(bg))
# Index
indexes(bg)
pData(bg) = read.csv("C:/Users/Susej/Documents/ballgown/phenodata_sus.csv")
head(pData(bg))
exon_transcript_table = indexes(bg)$e2t
transcript_gene_table = indexes(bg)$t2g
head(transcript_gene_table)
phenotype_table = pData(bg)
# Filtrar abundancias bajas
bg_filt <- subset(bg, "rowVars(texpr(bg)) > 1", genomesubset=TRUE)
expression_bg_filt = gexpr(bg_filt)
write.csv(expression_bg_filt, file="expression_bg_filt.csv")
# Identifiar transcritos y genes estadísticamente diferentes entre grupos
results_transcripts = stattest(bg_filt, feature="transcript",covariate= "Tratamiento",
adjustvars = c("family"), getFC=TRUE, meas="FPKM")
results_genes = stattest(bg_filt, feature="gene",covariate= "Tratamiento",
adjustvars = c("family"), getFC=TRUE, meas="FPKM")
#Agregar nombre y IDS a los genes
results_transcripts = data.frame(geneNames=ballgown::geneNames(bg_filt),
geneIDs=ballgown::geneIDs(bg_filt), results_transcripts)
results_genes = data.frame(geneNames=ballgown::geneNames(bg_filt),
geneIDs=ballgown::geneIDs(bg_filt), results_genes)

```