



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

GENES ASOCIADOS AL CRECIMIENTO
COMPENSATORIO EN EL CAMARÓN BLANCO DEL
PACÍFICO *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

María de Jesús Cota Quintero

La Paz, Baja California Sur, noviembre de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 24 del Mes de octubre 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:

"Genes asociados al crecimiento compensatorio en el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*"

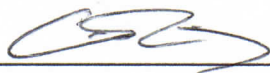
Presentada por el alumno:

María de Jesús Cota Quintero

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.

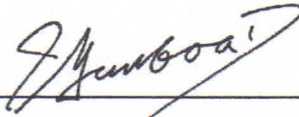
LA COMISIÓN REVISORA



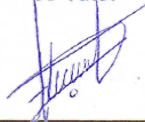
Dr. Alberto Peña Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dra. Regina Elizondo González
Co-Director de Tesis



Dr. Julián Gámboa Delgado
Co-Tutor



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. Regina Elizondo González
Cátedras CONACYT-CIBNOR, La Paz, B.C.S.
Co-Directora de tesis

Dr. Julián Gamboa Delgado
Universidad Autónoma de Nuevo León
Co-Tutor de tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. Regina Elizondo González
Dr. Julián Gamboa Delgado

Jurado de Examen

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. Regina Elizondo González
Dr. Julián Gamboa Delgado

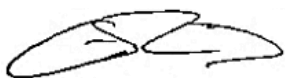
Suplente

Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva

Resumen

En México, la acuicultura de camarón representa un lugar preponderante debido a su importancia económica. Actualmente, dentro las nuevas estrategias de manejo de cultivo de camarón, se incluye un sistema basado en la restricción alimenticia temporal, aprovechando la capacidad de crecimiento compensatorio (CC) que tienen estos organismos. La información sobre los genes involucrados en este proceso biológico es limitada. Por lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue identificar grupos de genes asociados al CC en el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* sometido a diferentes regímenes de alimentación. Para ello, se realizó un bioensayo donde se evaluaron 4 tratamientos, 7 (R7), 14 (R14) y 21 (R21) días en los cuales se aplicó 50% de restricción alimenticia, seguida de un periodo de realimentación. Un tratamiento control (R0) se mantuvo con animales alimentados a saciedad. Además de evaluar el rendimiento productivo de los camarones, se determinó la composición bioquímica y se realizó un análisis de expresión diferencial a nivel transcripcional, comparando condiciones de alimentación a saciedad continua respecto condiciones de restricción alimenticia y posterior proceso de CC. Los tratamientos de 7 y 14 días lograron tener un crecimiento compensatorio completo al no encontrarse diferencias significativas en peso final, tasa de crecimiento y tasa de crecimiento específico ($p > 0.05$), obteniendo una reducción de hasta el 14.67% de alimento para el tratamiento R14. En cuanto a la composición bioquímica, se incrementó la movilización de lípidos como reservas energéticas producto de la realimentación durante el CC con respecto al control, disminuyendo las concentraciones de estos metabolitos en hepatopáncreas e incrementándolas en plasma. El análisis transcriptómico arrojó 276 genes expresados diferencialmente ($FC > 1.5$, $p < 0.05$), de los cuales se lograron anotar 109; 28 sobre-expresados relacionados al metabolismo energético por medio de la utilización de lípidos y aminoácidos de tipo glucogénico como forma de obtención de energía, así como genes encargados de la biotransformación de compuestos endógenos producto del estrés oxidativo relacionado al crecimiento acelerado, y 81 sub-expresados relacionados al metabolismo de carbohidratos y respuesta inmune. A pesar que la alimentación restringida temporalmente permite ahorro de alimento sin pérdidas de talla final de cosecha del camarón *P. vannamei*, los cambios en la expresión de genes presentados en este estudio sugieren una potencial desventaja en caso de presentarse un evento de estrés durante el crecimiento compensatorio.

Palabras clave: Crecimiento compensatorio, expresión de genes, *Penaeus vannamei*



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



Vo. Bo. Dra Regina Elizondo González
Co-Directora de tesis

Summary

In Mexico, aquaculture shrimp farming represents a preponderant place due to its economic importance. Currently, within the new management strategies for shrimp culture, a system based on temporary food restriction is used, taking advantage of the compensatory growth capacity (CC) that these organisms present. The information about the genes involved in this biological process is limited. Therefore, the objective of this project was to identify groups of genes associated to CC in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* subjected to different feeding regimes. For this purpose, it was carried out a bioassay with 4 treatments: 7 (R7), 14 (R14) and 21 (R21) days in which 50% of feeding restriction was applied followed by a period of *ad libitum* refeeding. A control treatment fed *ad libitum* continuously (R0). Besides evaluating shrimp productive performance, it was determined the biochemical composition and a differential expression analysis at transcriptional level comparing normal and continuous feeding conditions with the CC process. The treatments of 7 and 14 days were able to have a compensatory growth since there were not found significant differences in final weight, growth rate and specific growth rate ($p>0.05$), obtaining a reduction of up to 14.67% of feed for R14 treatment. As for biochemical composition, lipid mobilization as energetic reserves product of feedback was increased in CC treatment with regard to control, decreasing concentrations of these metabolites in hepatopancreas and increasing them in plasma. The transcriptional analysis showed 276 differentially expressed genes ($FC>1.5$, $p<0.05$), from which 109 were annotated: 28 over-expressed were related to energy metabolism through the use of lipids and glycogenic amino acids as a way of obtaining energy, as well as genes responsible for the biotransformation of endogenous compounds as a result of oxidative stress related to accelerated growth, and 81 under-expressed related to carbohydrate metabolism and response to immune response. Although the temporal feed restriction allows cost savings without losses in the final harvest size of the *P. vannamei* shrimp, the changes in the expression of genes presented in this study suggest a potential disadvantage in case of a stress event during compensatory growth.

Keywords: Compensatory growth, gene expression, *Penaeus vannamei*



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



Vo. Bo. Dra Regina Elizondo González
Co-Directora de tesis

Dedicatoria

A los pilares de mi vida y mi formación

Mis padres, María de Jesús Quintero y José David Cota

A mis hermanos

José David y Karla María

Y a mi compañero de aventuras

Noé Fernando López

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por permitirme realizar mis estudios de maestría y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (no. 715333)

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

A la empresa Larvas Gran Mar, principalmente a Samuel Echeverría y a Omar Camorlinga, por amablemente donar las post-larvas de camarón.

A mi Comité Tutorial, Dr. Alberto Peña Rodríguez, muchas gracias por confiar en mí y permitirme ser parte de este y anteriores proyectos. Dra. Regina Elizondo González y Dr. Julián Gamboa Delgado, a los tres, muchas gracias por su tiempo dedicado, por sus enseñanzas, consejos y paciencia.

A los Laboratorios de CIBNOR y su personal responsable por su ayuda con la realización del presente trabajo:

- Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola, Biol. Sandra de La Paz Reyes.
- Laboratorio de Bioquímica Fisiológica, M.C. Roberto Herrera Hernández
- Laboratorio de Genómica y Bioinformática, M.C Gabriela Mendoza Carrión. Gaby muchas gracias por siempre recibirme con una sonrisa, por todas sus atenciones y paciencia.

Al personal de Posgrado, Dra. Gracia Gómez, Lic. Leticia G. Rubio, Lic. Osvelia Ibarra, Ing. Horacio Sandoval y Tania Núñez Valdez por su disposición y amabilidad ante cualquier duda.

A Miguel Arévalo, Aldahir Núñez, Susej López, Diana Barajas y Dr. Eduardo Quiroz por toda su ayuda en la realización de los bioensayos.

A Luis Díaz, Nadia Islas y Carlos Ramos por brindarme su amistad y hacer esta etapa más divertida.

Y especialmente agradezco a mi familia, a mis padres María de Jesús Quintero y José David Cota por todo su amor y apoyo incondicional, por impulsarme a cumplir mis metas, porque sin ustedes este logro no hubiera sido posible. A mis hermanos José David y Karla María por todo su cariño, por siempre estar dispuestos a ayudarme, por todos sus consejos y darme el mejor ejemplo tanto en el ámbito personal como profesional, son mi inspiración. Silvia, Silvana, Sabrina y Miguel muchas gracias por su apoyo, cariño y por hacer mi estancia en La Paz muy feliz.

A mi novio Noé López, gracias por estar presente durante todo este proceso, por motivarme a crecer, por todo tu amor, por darme las palabras de aliento para poder continuar, por hacerme reír en los momentos de estrés a pesar de la distancia.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Abreviaturas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Acuicultura	3
2.2 Camarón blanco del Pacífico <i>Penaeus vannamei</i>	5
2.3 Alimentación en camaronicultura	7
2.4 Restricción alimenticia como estrategia de cultivo	9
2.5 Crecimiento compensatorio	9
2.6 Efecto de la restricción alimenticia en la expresión de genes	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
5.1. Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares	16
6. MATERIAL Y MÉTODO	17
6.2 Análisis bioquímicos	19
6.2.1 Carbohidratos totales	20
6.2.2 Glucosa	20
6.2.3 Lactato	21
6.2.4 Glucógeno	21
6.2.5 Lípidos totales	22
6.2.6 Triglicéridos	22
6.2.7 Colesterol	22
6.2.8 Proteínas totales	22
6.3 Análisis de expresión diferencial	23
6.3.1 Procesamiento de ARN	23
6.3.2 Análisis bioinformático	23
7. RESULTADOS	25
7.1 Evaluación del rendimiento productivo de <i>P. vannamei</i> sometido a diferentes periodos de restricción alimenticia	25
7.1.1 Tasa de crecimiento específica a los 7 días post realimentación	29
7.2 Análisis bioquímicos	32
7.3 Análisis bioinformático	33
7.3.1 Limpieza de lecturas	34
7.4 Análisis de expresión diferencial	34
7.4.1 Análisis de componentes principales (PCA)	34

7.4.2 Genes sobre expresados	36
7.4.3 Genes sub expresados	38
7.5 Ontología de genes (GO terms)	39
7.6 Anotación funcional de rutas metabólicas en KEGG	44
8. DISCUSIÓN	47
8.1 Evaluación del rendimiento productivo de <i>P. vannamei</i> sometido a diferentes tratamientos de restricción alimenticia	47
8.2 Composición bioquímica	49
8.3 Análisis de expresión diferencial	50
8.3.1 Genes sobre expresados durante el crecimiento compensatorio de <i>P.</i> <i>vannamei</i>	50
8.3.2 Genes sub expresados durante el crecimiento compensatorio de <i>P. vannamei</i>	52
9. CONCLUSIONES	54
10. LITERATURA CITADA	55
11. ANEXOS	67

Lista de figuras

Figura 1. Producción acuícola mundial de animales acuáticos y algas, 1990-2018 (FAO, 2020).	4
Figura 2. Serie histórica de la producción de camarón (peso vivo en toneladas) (CONAPESCA, 2018).....	5
Figura 3. Morfología externa de camarones peneidos (Hendrickz, 1996).	6
Figura 4. Diseño experimental de bioensayo de restricción alimenticia en <i>P. vannamei</i>	17
Figura 5. Peso promedio de <i>P. vannamei</i> a los diferentes tiempos experimentales en los tratamientos R0, R7, R14 y R21 ($p < 0.05$, $n=3$).....	25
Figura 6. Promedio final de ganancia en peso por tratamiento expresada en gramos. 27	
Figura 7. Consumo individual total en gramos de cada uno de los tratamientos.	28
Figura 8. Factor de conversión alimenticia de los tratamientos experimentales.	29
Figura 9. Tasa de crecimiento específica entre el día 7 y 14 de experimentación (para el tratamiento R7 a los 7 días post realimentación).....	30
Figura 10. Tasa de crecimiento específica entre el día 14 y 21 de experimentación (para el tratamiento R14 a los 7 días post realimentación).	31
Figura 11. Tasa de crecimiento específica entre el día 21 y 28 de experimentación (para el tratamiento R21 a los 7 días post realimentación).	32
Figura 12. Calidad de lecturas correspondientes al tratamiento control (Ar0_21a). Forward (A) y Reverse (B) en donde el eje "X" representa la posición de los nucleótidos en pares de bases y el eje "Y" el valor de Q.....	34
Figura 13. Análisis de componentes principales de la expresión génica por tratamiento.	35
Figura 14. Agrupamiento de librerías en relación a los genes sobre expresados y sub expresados entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio.	36
Figura 15. Porcentaje de genes expresados diferencialmente entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio asociados a procesos biológicos de acuerdo a la clasificación GO (Gene Ontology).	40
Figura 16. Porcentaje de genes expresados diferencialmente entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio asociados a funciones moleculares de acuerdo a la clasificación GO (Gene Ontology).	42
Figura 17. Porcentaje de genes expresados diferencialmente entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio asociados a componentes celulares de acuerdo a la clasificación GO (Gene Ontology).	43
Figura 18. Rutas metabólicas asociadas a genes sobre expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control de acuerdo a la clasificación KEGG.	45
Figura 19. Rutas metabólicas asociadas a genes sub expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control de acuerdo a la clasificación KEGG.	46

Lista de tablas

Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>Penaeus vannamei</i>	5
Tabla II. Estrategias de cultivo y alimentación utilizadas para cultivar camarones desde postlarvas hasta el tamaño del mercado ¹	8
Tabla III. Parámetros zootécnicos de camarones después de 49 días de experimentación, sometidos a restricción parcial de alimento (50%) durante 0, 7, 14 y 21 días.....	26
Tabla IV. Composición bioquímica de hepatopáncreas de <i>Penaeus vannamei</i> bajo las 3 condiciones experimentales.	33
Tabla V. Composición bioquímica de plasma de <i>Penaeus vannamei</i> en las 3 condiciones experimentales.	33
Tabla VI. Genes sobre expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control.....	37
Tabla VII. Genes sub expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control.....	38

Abreviaturas

µL	Microlitros
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
CC	Crecimiento compensatorio
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
CONAPESCA	Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca
FCA	Factor de conversión alimenticia
FPKM	Fragmentos de transcrito por kilobase por millón de lecturas mapeadas
g	Gramos
GO	Gene Ontology
INAPESCA	Instituto Nacional de Pesca
KEEG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto
L	Litros
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
PF	Peso final
pb	Pares de bases
Ref	Referencia
r.p.m.	Revoluciones por minuto
TC	Tasa de crecimiento
TCE	Tasa de crecimiento específico
ups	Unidades prácticas de salinidad

1. INTRODUCCIÓN

La tasa de crecimiento de un animal está determinada por su genética y factores ambientales, siendo el principal la disponibilidad del alimento. En el medio natural, los animales pueden estar expuestos a periodos de escaso alimento dependiendo del sitio y época del año, por lo que la capacidad de almacenaje de reservas energéticas y de adaptación metabólica es vital para su supervivencia. Una vez que las condiciones favorables son restablecidas, los animales pueden entrar en un proceso fisiológico conocido como crecimiento compensatorio (CC), definido como el aumento en la tasa de crecimiento después de un periodo de restricción alimenticia, logrando alcanzar o superar el peso de organismos alimentados continuamente sin restricción (Ali *et al.*, 2000; Hornick *et al.*, 2000; Oksbjerg y Therkildsen, 2017). Esta capacidad depende de factores tales como el tipo de restricción, duración y severidad (Román-Trufero *et al.*, 2019), los cuales en casos extremos llevan al punto de no retorno, es decir, la pérdida de esta capacidad de CC.

Actualmente el crecimiento compensatorio producto de la restricción alimenticia es empleado en la acuicultura como estrategia de manejo del alimento, ya que su meta principal es la de conseguir la mayor producción, en el menor tiempo y al mínimo costo. La importancia de la acuicultura radica en que se trata de una de las actividades con mayor desarrollo en los últimos años, aportando una producción acuícola mundial de 114,5 millones de toneladas en 2018, lo que se traduce a 263.6 millones de dólares (FAO, 2020). En México, la principal industria acuícola es el cultivo de camarón, que produce actualmente 158,014 toneladas (CONAPESCA, 2018) siendo *Penaeus vannamei* la especie de mayor importancia.

El éxito en el cultivo de las diferentes especies de camarón depende en gran parte de una adecuada nutrición y un buen manejo del alimento (Artiles *et al.*, 1996), ya que este representa entre el 30 y 60% del total de costos operativos de la actividad. Por otra parte, un manejo inadecuado de alimento representa la principal fuente de deterioro de la calidad del agua, lo cual tiene implicaciones ambientales tales como la eutrofización de los efluentes como resultado de la excesiva liberación de nutrientes, que repercute en una pobre respuesta productiva de los organismos en cultivo y en la rentabilidad económica del mismo (Martínez-Córdova, 2008).

Aun cuando la restricción alimenticia promete ser una estrategia de ahorro de alimento, la información sobre la capacidad máxima de restricción alimenticia a la cual pueden ser sometidos los camarones, y los genes involucrados en este proceso biológico es limitada. Por lo tanto; en este trabajo se seleccionó como modelo de estudio al camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*, el cual fue sometido a diferentes tratamientos de restricción alimenticia parcial y temporal, y se evaluó su capacidad de crecimiento compensatorio por medio de la determinación del rendimiento productivo, composición bioquímica e identificación de genes asociados a este proceso.

2. ANTECEDENTES

2.1 Acuicultura

La acuicultura se encarga del cultivo de especies acuáticas incluidos peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas, ya sea de agua dulce, salobre o salada. Esta actividad forma parte del sector productivo primario pues se encarga de satisfacer las necesidades alimentarias de la población. Para hacer más eficiente su producción se requiere de la intervención de técnicas tales como la alimentación con dietas balanceadas, protección contra depredadores y control de enfermedades entre otras (APROMAR, 2008; Cuéllar *et al.*, 2018; Haroun *et al.*, 2007; Luchini y Panné-Huidobro, 2008; Platas-Rosado y Vilaboa-Arroniz, 2014).

De acuerdo al último reporte de la FAO (2020), la acuicultura sigue creciendo más rápido que otros sectores preponderantes de producción de alimentos, reportando para 2018 una producción mundial de 114.5 millones de toneladas, estimadas en un valor de primera venta de 263,600 millones de USD (Fig. 1). La producción total incluye 82.1 millones de toneladas de animales acuáticos (250,100 millones de USD), 32.4 millones de toneladas de algas acuáticas (13,300 millones de USD) y 26,000 toneladas de conchas marinas ornamentales y perlas (179,000 USD).

En México, el cultivo de camarón es la principal industria acuícola ocupando el primer lugar en producción en términos de su valor comercial, registrándose para 2018 una producción de 158,014 Ton (Fig. 2) y generando así ingresos de 572,027.19 millones de USD (CONAPESCA, 2018).

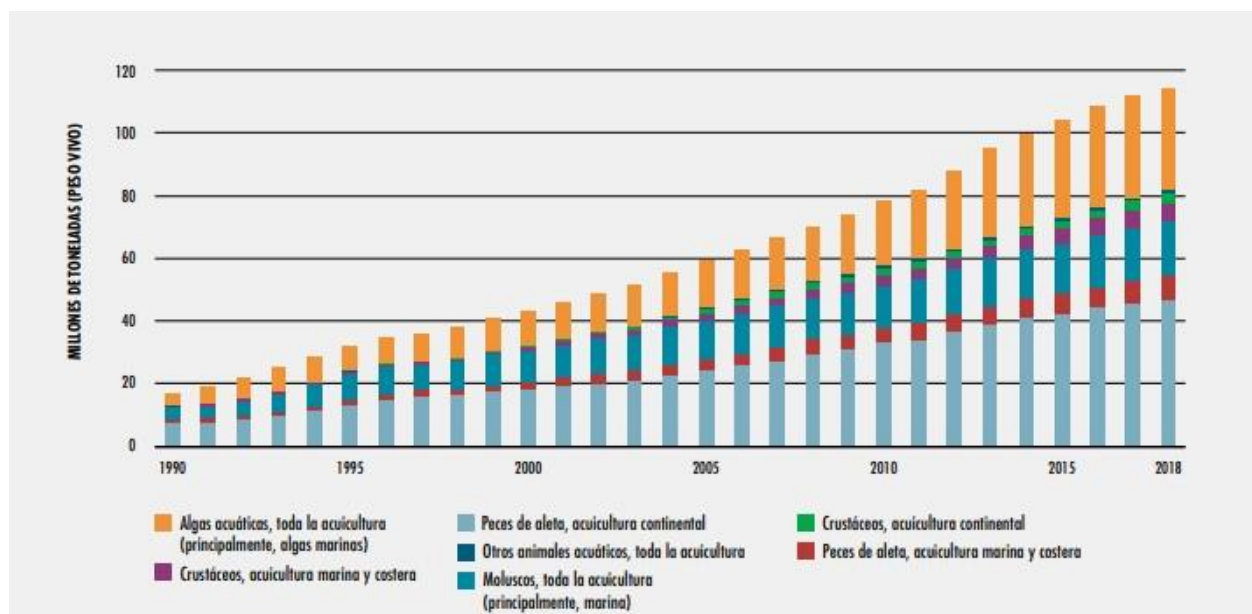


Figura 1. Producción acuícola mundial de animales acuáticos y algas, 1990-2018 (FAO, 2020).

El cultivo de camarón en México se comienza a explorar a finales de los 60's con el camarón café *Farfantepenaeus californiensis*, por parte del tecnológico de Monterrey Campus Guaymas (INAPESCA, 2018). Posteriormente en la década de los 70's, se continúa con el cultivo de camarón azul *Penaeus stylirostris*. Para la década de los 80's el cultivo de camarón blanco *Penaeus vannamei* (también llamado *Litopenaeus vannamei*) toma fuerza con las primeras granjas comerciales principalmente en los estados de Sinaloa y Sonora, y se mantiene hasta la actualidad como la principal especie de camarón de cultivo en nuestro país (CONAPESCA, 2018).

Penaeus vannamei es la especie de mayor importancia debido a su alta domesticación, resistencia a enfermedades, existencia de programas de mejora genética y una mayor tolerancia a las condiciones ambientales en cautiverio en comparación de otras especies de camarón (Carrasco-Escalante y León-Balderrama, 2017; Santiago *et al.*, 2009).

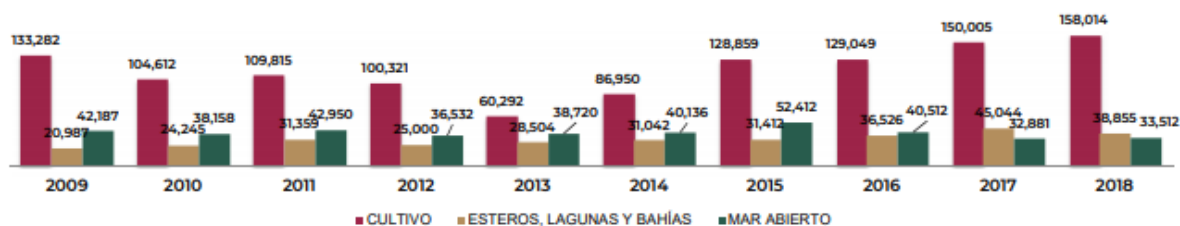


Figura 2. Serie histórica de la producción de camarón (peso vivo en toneladas) (CONAPESCA, 2018).

2.2 Camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*

El camarón blanco del Pacífico es un crustáceo decápodo que pertenece a la familia Penaeidae (Tabla 1). Su morfología (Fig. 3) consta de un cuerpo alargado con una cabeza (5 segmentos), tórax (8 segmentos) y abdomen (6 segmentos), en donde la cabeza y el tórax se fusionan formando el cefalotórax compuesto de un rostro bien desarrollado con dientes dorsales (8 o 9) y ventrales (1 o 2), un par de antenas, anténulas, 3 pares de maxilípedos usados para la alimentación y 5 de periópodos para locomoción, en el abdomen los pleópodos o patas nadadoras se localizan en los primeros 5 pares y en el último par se encuentra la cola que se compone de 2 pares de urópodos y el telson (Dall *et al.*, 1990; Dugassa y Gaetan, 2018; INAPESCA, 2013).

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Penaeus vannamei*.

Reino: **Animalia**

Phylum: **Arthropoda**

Subphylum: **Crustacea**

Clase: **Malacostraca**

Subclase: **Eumalacostraca**

Orden: **Decapoda**

Suborden: **Dendrobranchiata**

Superfamilia: **Penaeoidea**

Familia: **Penaeidae**

Género: **Penaeus**

Especie: ***vannamei***

La estructura interna de *P. vannamei* cuenta con un sistema nervioso ventral compuesto de un cerebro trilobulado con un ganglio supraesofágico y ganglios en el tórax y abdomen (Martínez-Córdova, 1993). El sistema digestivo se compone de boca, esófago, intestino anterior medio y posterior responsables de la ingestión, la digestión mecánica, la hidrólisis química y bioquímica y la absorción celular. De igual forma presentan un sistema circulatorio abierto donde el corazón muscular bombea hemolinfa a través de las arterias anteriores, posteriores y ventrales (Tuan, 2016). El aparato respiratorio está compuesto por dendrobranquias situadas en las partes laterales del cefalotórax, protegidos por una cámara, en este lugar se realiza el intercambio de gases (Martínez-Córdova, 1993).

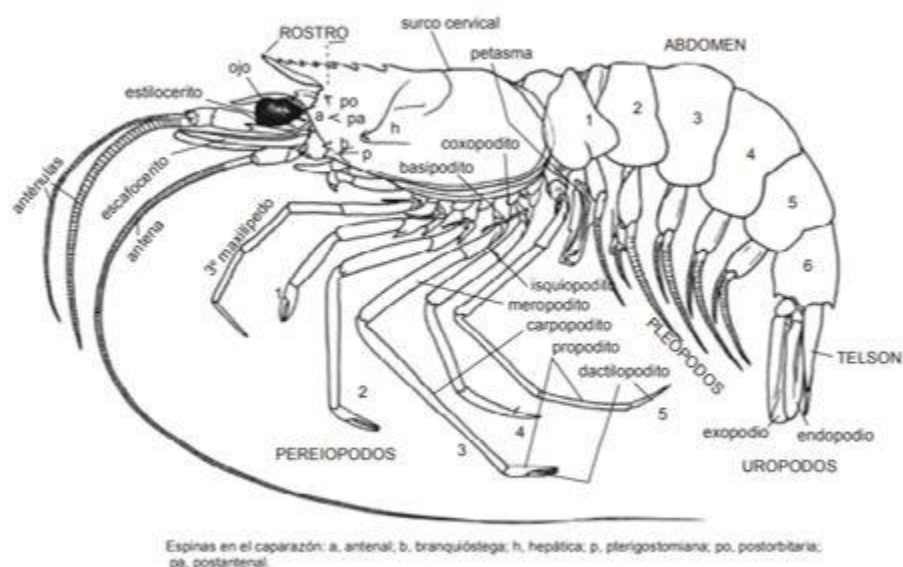


Figura 3. Morfología externa de camarones peneidos (Hendrickz, 1996).

Es una especie nativa de la costa oriental del Océano Pacífico distribuyéndose desde el estado de Sonora hasta Perú, de hábitat marino tropical donde la temperatura del agua es normalmente superior a los 20 °C (Gucic, 2008) y toleran un intervalo de salinidad entre 2 - 40 unidades prácticas de salinidad (ups), con un óptimo de 35 ups. Los adultos viven en ambientes marinos tropicales y subtropicales con fondos arenosos, mientras que las postlarvas pasan la etapa juvenil y pre-adulta en estuarios y lagunas costeras (INAPESCA, 2013).

2.3 Alimentación en camaronicultura

En la camaronicultura, las técnicas para el cultivo de camarones se clasifican dependiendo de la densidad de siembra en: extensivas, semi-intensivas, intensivas y súper-intensivas donde cada una presenta diferente grado de tecnificación, tipo de alimento y estrategias de alimentación (Tabla II).

La alimentación es uno de los factores de mayor relevancia, ya que representa entre el 30 y 60% de los costos operativos tanto en cultivos semi-intensivos como intensivos (Martínez-Córdova *et al.*, 2002; Tacon *et al.*, 2013). Por lo tanto, es indispensable implementar buenas estrategias de manejo del alimento, donde hay que tener en cuenta el factor de conversión alimenticia (FCA) que indica en gran medida la eficiencia de utilización de los nutrientes presentes en el alimento. El FCA depende de diversos aspectos tales como la calidad nutricional, estabilidad en el agua, cantidad, frecuencia y forma de proporcionar del alimento (Vega-Villasante *et al.*, 2000).

En cuanto a la forma en la que es proporcionado el alimento, se conocen algunas técnicas como “el boleo”, alimentación en charolas o en base a la disponibilidad de alimento natural. La alimentación por boleo se apoya en el uso de canoas o pequeñas embarcaciones para transportar el alimento y distribuirlo en todo el estanque con lanzamientos manuales para la ración diaria basándose en tablas de alimentación (Bador, 2000; Martínez-Córdova, 2000, 2002). También es posible emplear sopladores de aire que permiten la alimentación por boleo desde la periferia de los estanques. Para el caso de la alimentación en charolas, estas se reparten en todo el estanque con un ajuste permanente de la ración en función del consumo (Martínez-Córdova, 2000; Salame, 1993). Otra estrategia implementada por la Universidad de Sonora (Martínez-Córdova *et al.*, 1998, 2000) es la de ajustar la ración a la biomasa de alimento natural en el sistema.

Respecto a la frecuencia con la que se suministra el alimento según lo mencionado por Molina-Poveda *et al.* (2008), alimentar durante periodos de incremento de actividad como tarde y noche podría resultar en un mejor consumo de alimento y conversión alimenticia (FCA). Sin embargo para fines prácticos (visibilidad) es común alimentar durante las horas de luz.

Tabla II. Estrategias de cultivo y alimentación utilizadas para cultivar camarones desde postlarvas hasta el tamaño del mercado¹.

	Cultivo extensivo al aire libre	Cultivo extensivo al aire libre	Cultivo semi-intensivo al aire libre	Cultivo intensivo al aire libre	Cultivo intensivo
Densidad de siembra	< 5/m ²	5-10/m ²	12-25 / m ² 10-20 / m ³	40-140/ m ² 25-75/m ³	200-2000/m ² 120-750/m ³
Horas de trabajo (personas/ha)	Normalmente < 0.1	Normalmente < 0.1	Bajo a moderado 0.1-0.5	Alto 0.4-2	Alto, 1-3
Factor de conversión alimenticia	-	0.9–1.3	1.2–1.75	1.4–2.0	1.4–3.0
Costos de producción (\$/kg de camarón)	1.00–2.00	1.70–2.50	2.20–3.30	3.50–5.00	4.00–7.50

¹Modificado de Tacon *et al.* (2013).

2.4 Restricción alimenticia como estrategia de cultivo

Actualmente, una de las principales dificultades a las que se enfrenta la acuicultura es la de lograr un balance entre el crecimiento rápido de los organismos cultivados y el uso eficiente del alimento suministrado. Las estrategias de alimentación tradicionales como el uso de tablas de alimentación o charolas pueden provocar un desperdicio del mismo, así como afectaciones a los parámetros zootécnicos de los organismos debido a las variaciones rítmicas del día a día en el apetito, tales como la tasa de crecimiento y conversión alimenticia (Gabriel *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2017; Maciel, 2018).

En muchas especies se ha demostrado que la restricción alimenticia como estrategia de alimentación es favorable para la acuicultura, debido a que es una práctica simple y de fácil manejo que permite la reducción de los costos de producción y mano de obra. Por otra parte, al disminuir el desperdicio de alimento, se mejora la calidad del agua al reducir las concentraciones de nutrientes (compuestos nitrogenados y fósforo principalmente) y la materia orgánica en sus efluentes.

Sin embargo, la restricción alimenticia temporal tiene como característica principal la inducción del crecimiento compensatorio en los organismos (Assis *et al.*, 2020; Blanquet y Oliva-Teles, 2010; Zhu *et al.*, 2016) el cual, es un proceso fisiológico que se describe como una tasa de crecimiento acelerada resultante de una realimentación adecuada después de un período de restricción de alimento o exposición a condiciones desfavorables (Ali *et al.*, 2003). De ahí el interés de las empresas acuícolas a la implementación de la restricción alimenticia como estrategia, la cual puede incluir una variedad de técnicas tales como ayuno o restricción parcial seguido de un periodo de realimentación y ciclos de restricción – realimentación a lo largo de la duración del cultivo.

2.5 Crecimiento compensatorio

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento compensatorio se refiere a la capacidad de un organismo de acelerar su crecimiento después de un periodo de escasez de alimento o desarrollo restringido (Fabridge *et al.*, 1992; Hornick *et al.*, 2000; Mangel y Munch, 2005), el cual ha sido observado durante muchos años tanto en plantas, invertebrados y vertebrados (Mangel y Munch 2005).

Los organismos en crecimiento compensatorio pueden tener tres tipos de respuestas: una compensación total, compensación parcial o una ausencia de compensación. Una compensación total o completa, es cuando se logra alcanzar la talla de organismos no restringidos. Una compensación parcial cuando se logra tener un incremento en la tasa de crecimiento, sin embargo, no se alcanza la talla de los organismos no restringidos. Por último, en la no compensación no se incrementa la tasa de crecimiento durante el periodo de realimentación (Alves, 2003; Olazábal y San Martín, 2008).

La respuesta compensatoria, tanto en laboratorio como en la naturaleza, depende de una serie de factores tales como el tipo, duración y severidad de la restricción. El tipo hace referencia a si la limitación de la restricción es total (sin consumo de alimento), o parcial donde se incluye un consumo de alimento menor a las condiciones normales, o la restricción de algún nutriente en específico. La duración es el tiempo del periodo de restricción, el cuál puede ser corto, intermedio o largo. Por último, la severidad depende de la combinación de los factores anteriores (Ojeda *et al.*, 2007; Olazabal y San Martín, 2008) y alteraciones en estos 3 factores pueden llevar al animal a perder esa capacidad de incrementar su tasa de crecimiento lo que se conoce como punto de no retorno.

La hiperfagia o incremento del consumo de alimento frecuentemente ha sido reportado como mecanismo involucrado en la respuesta compensatoria (Onischuk y Kennedy, 1990; Ryan *et al.*, 1993) y una alta eficiencia de utilización de los alimentos (Cartens *et al.*, 1991). El crecimiento compensatorio puede ser considerado como un mecanismo fisiológico de ajuste interno para que los animales se adapten a cualquier situación de variaciones dramáticas en el entorno (Ali *et al.*, 2003).

Diversos trabajos han descrito los efectos de diferentes tratamientos de restricción alimenticia sobre el crecimiento de algunas especies marinas, entre los que destacan los crustáceos. Lin *et al.* (2008) trabajaron con la especie *Penaeus vannamei*, sometiendo a los organismos a periodos cortos de ayuno, que fueron desde 1 a 3 días seguidos de un periodo de realimentación, en el cual observaron un aumento en la eficiencia de conversión alimenticia y proteica, además presentaron un crecimiento compensatorio completo al alcanzar una talla similar a la de los organismos del tratamiento control.

Por otra parte, Zhu *et al.* (2016) evaluaron los efectos de la alimentación cíclica en la misma especie (*P. vannamei*) por medio de tratamientos de 1, 2 y 3 días de ayuno seguido de un periodo de realimentación de 3, 5 y 9 días respectivamente. Reportaron que no existieron diferencias significativas en cuanto a peso final y tasa de crecimiento específico (TCE) con respecto al control, sin embargo, el factor de conversión alimenticia (FCA) fue significativamente menor en los tratamientos de ayuno indicando mejor utilización de nutrientes. Al término del experimento se observó una supervivencia del 100% en todos los tratamientos, lo que indica un crecimiento compensatorio total con ahorro de alimento para *P. vannamei* bajo dichas condiciones experimentales.

Siguiendo la misma línea de investigación, Wu *et al.* (2001) trabajaron con otra especie, *Fenneropenaeus chinensis*, suministrando diferentes porcentajes de alimento (4, 8 y 12 % del peso corporal del organismo) seguido de un periodo de realimentación *ad libitum*. Se concluyó que existió crecimiento compensatorio parcial y total, pues sólo el tratamiento con mayor cantidad de alimento suministrada (12% con respecto al peso corporal) presentó valores de talla y peso similares a los obtenidos en el tratamiento control. Así mismo, se observó una mayor eficiencia de conversión alimenticia aunada a una mayor ingesta de alimento.

Con respecto a la composición bioquímica durante el proceso de crecimiento compensatorio, el mismo autor reportó el incremento de la concentración de lípidos en el tratamiento del 12% de alimentación, encontrándose diferencias significativas respecto al control al final del experimento (30 días después de iniciado el periodo de alimentación). En cuanto a humedad, cenizas y proteína no hubo diferencias significativas entre los grupos.

Stumpf *et al.* (2019) evaluaron la viabilidad del crecimiento compensatorio en el crustáceo *Cherax quadricarinatus* sometándolo a ciclos de ayuno – realimentación por 20 días, seguido de una fase de realimentación de 40 días. Encontraron durante la etapa de crecimiento compensatorio (día 40, donde se presentó la mayor TCE) valores de proteína y glucógeno menores a los del grupo control, por el contrario, la concentración de lípidos fue mayor en el tratamiento sometido a restricción en dicho tiempo.

Por otro parte Rahman *et al.* (2019), reportaron para la especie *Macrobrachium rosenbergii*, una concentración de humedad, lípidos y cenizas más alta en el tratamiento sometido a restricción alimenticia (4 días de alimentación seguido de 4 días de ayuno) con respecto al control, lo que indica el engorde de las cavidades corporales y los órganos internos producto del crecimiento acelerado. Por el contrario, se observaron valores de proteína más altos en el tratamiento control (alimentado a saciedad durante la duración del experimento).

2.6 Efecto de la restricción alimenticia en la expresión de genes

La transcriptómica se refiere al estudio del conjunto completo de transcripciones en una célula, tejido u organismo específico para una etapa de desarrollo o condición fisiológica determinada (Wang *et al.*, 2009) lo que da una idea amplia de los procesos celulares que están activos e inactivos. Esta herramienta ha sido utilizada ampliamente en la acuicultura para la identificación eficaz y el análisis de expresión de genes implicados en el crecimiento, la reproducción, el desarrollo, la inmunidad, las enfermedades, el estrés y la toxicología (Chandhini y Rejish-Kumar, 2018).

Según lo indicado por Chandhini y Rejish-Kumar (2018), el transcriptoma de un organismo presenta variaciones según la etapa de desarrollo, condición fisiológica y el entorno externo en el que se encuentre. Es por ello que es importante conocer los genes expresados diferencialmente de acuerdo a las técnicas de cultivo implementadas en la acuicultura para conocer posibles beneficios o afectaciones en los organismos (Clavero *et al.*, 2007).

En cuanto al efecto de la restricción alimenticia en organismos marinos solo se tienen reportes de algunas especies de peces, como el estudio elaborado por He *et al.* (2015), donde compararon la respuesta transcriptómica de *Ctenopharyngodon idella* durante el proceso de crecimiento compensatorio y bajo condiciones de alimentación normales (control). Esto, sometiendo a los peces a un periodo de restricción alimenticia (ayuno) durante una semana, seguido de un periodo de realimentación (una semana), logrando identificar una sobre expresión de genes relacionados con la miosina lo cual indica que se produjo la biosíntesis de esta o músculo, resultando en un aumento de peso después de la realimentación.

En cuanto a la sub expresión, encontraron genes relacionados con la metilación y ubiquitinación de proteínas, además de proteínas de hidrólisis específicas del músculo, genes asociados con el apetito e intervención en la respuesta a emergencias celulares. Por lo anterior los autores sugieren que después de la realimentación, los peces salen de la respuesta de emergencia y la presencia de alimentos estimula el apetito. Posteriormente, las proteínas musculares ya no se utilizan como la principal fuente de energía y se produce un rápido crecimiento compensatorio.

Otra investigación realizada por Johansen y Overtruf (2006), reporta que durante la realimentación de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), sufre cambios en las vías metabólicas específicas en el músculo dando como resultado hipertrofia de los miotubos, así como una alteración en los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo. Sin embargo, sugieren que el crecimiento acelerado observado probablemente sea impulsado por cambios en el metabolismo muscular normal.

Liu *et al.* (2020) identificaron genes relacionados con el crecimiento muscular durante el crecimiento compensatorio en la especie *Siniperca chuatsi*, como Mhc y Mlc relacionados con la tasa de crecimiento, promoviendo la hiperplasia de miofibras y el crecimiento indeterminado, además MyoD relacionado con la detección y regulación del hambre.

Si bien existe información sobre los efectos del crecimiento compensatorio producto de la restricción alimenticia en la expresión de genes de diversas especies de peces de interés comercial, el conocimiento en especies de camarón incluyendo a *P. vannamei* es escaso.

3. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco del pacífico *P. vannamei* representa una de las principales especies acuícolas de importancia económica en México y el mundo. El alimento balanceado puede representar más de la mitad costo de producción en el cultivo de camarón.

La restricción alimenticia temporal promete ser una estrategia de ahorro de alimento dentro de la camaronicultura, sin embargo, no se conoce el efecto que tiene sobre la expresión de genes asociados al crecimiento compensatorio de *P. vannamei*. Por lo tanto, el conocer que genes expresados diferencialmente están involucrados en este proceso permitirá dilucidar posibles beneficios o afectaciones a nivel fisiológico por el uso de esta estrategia durante los ciclos de cultivo.

4. HIPÓTESIS

Dado que es posible por medio de la restricción alimenticia temporal inducir diferencias en las tasas de crecimiento en el camarón blanco *P. vannamei*, se espera que exista una expresión diferencial de genes asociados al crecimiento compensatorio.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar grupos de genes asociados al crecimiento compensatorio en el camarón blanco del Pacífico *P. vannamei* sometido a diferentes regímenes de alimentación.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el rendimiento productivo de los camarones bajo los diferentes periodos de restricción alimenticia.
2. Evaluar la composición bioquímica de los camarones bajo los diferentes periodos de restricción alimenticia.
3. Realizar un análisis de expresión diferencial a nivel transcripcional en camarones durante el proceso de crecimiento compensatorio.

6. MATERIAL Y MÉTODO

Para la determinación de la capacidad de crecimiento compensatorio en camarón, se realizó un bioensayo *in vivo* con juveniles de *P. vannamei* con un peso promedio inicial de 1.08 ± 0.3 g durante 7 semanas en el laboratorio húmedo de nutrición acuícola de CIBNOR.

Se evaluaron 4 tratamientos, un tratamiento control el cual fue alimentado a saciedad durante las 7 semanas de duración del experimento, el tratamiento R7 (7 días de restricción del 50% del alimento y 42 días de alimentación a saciedad), el tratamiento R14 (14 días de restricción del 50% del alimento y 35 días de alimentación a saciedad), y por último el tratamiento R21 (21 días de restricción del 50% del alimento y 28 días de alimentación a saciedad) (Fig. 4).

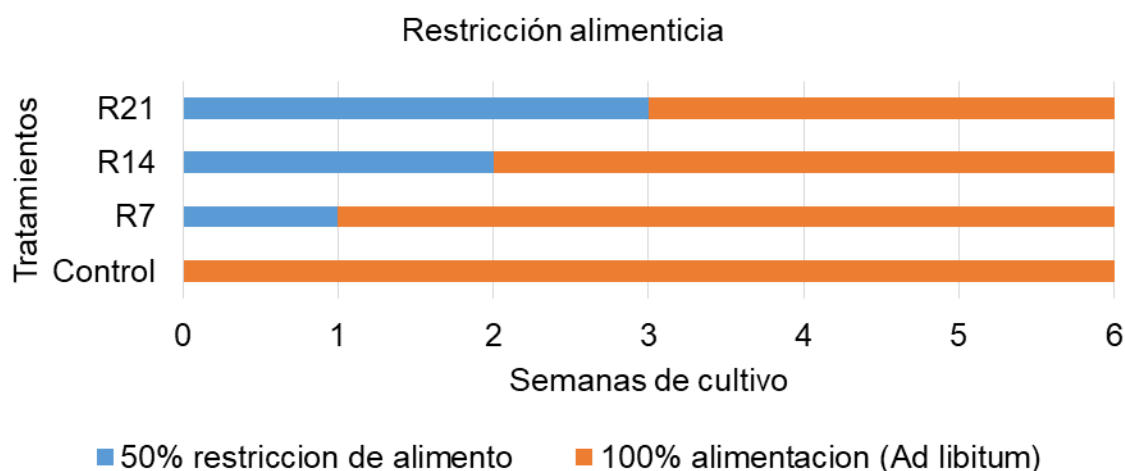


Figura 4. Diseño experimental de bioensayo de restricción alimenticia en *P. vannamei*.

Cada tratamiento consistió en 4 réplicas conteniendo 12 camarones cada una. Los animales se colocaron en acuarios de 60 L con agua de mar, temperatura controlada de $28 \text{ °C} \pm 0.5$, aireación continua, recambio del 50% de agua diariamente y biometrías cada semana. Se realizaron tomas de muestra de hemolinfa, músculo y hepatopáncreas al término del periodo de restricción alimenticia y 7 días después de iniciada la realimentación de cada tratamiento, además de muestras de los respectivos controles. Al finalizar el bioensayo se determinaron los siguientes parámetros zootécnicos:

- **Ganancia en peso (GP):** ganancia en gramos por camarón (Álvarez *et al.*, 2003)

$$GP = pf - pi$$

(1)

Dónde: pf = peso final del organismo y pi = peso inicial del organismo

- **Tasa de crecimiento (TC%):** crecimiento ponderal promedio, expresado en porcentaje (Flores-Leyva, 2006)

$$(TC\%) = \frac{pf - pi}{pi} \times 100$$

(2)

Dónde: pf = peso final del organismo y pi = peso inicial del organismo

- **Tasa de crecimiento específico (TCE % día):** crecimiento promedio del organismo al día (Luna-González, 2013)

$$TCE (\%)día = \frac{100x(\ln pf - \ln pi)}{t}$$

(3)

Dónde: pf = peso final del organismo, pi = peso inicial del organismo y t = duración en días

- **Alimento consumido (AC):** expresado en g/camarón/día (Flores-Leyva, 2006).

$$AC = \frac{\text{Alimento total consumido}}{Ni + Nf \div 2 \times \text{tiempo (días)}}$$

(4)

Dónde: Ni = número de organismos iniciales y Nf = número de organismos finales

- **Factor de conversión alimenticia (FCA):** cantidad de alimento en gramos necesaria para que el camarón aumente una unidad de peso (Álvarez *et al.*, 2003; Flores-Leyva, 2006).

$$FCA = \frac{Aac(g)}{Ipc(g)}$$

(5)

Dónde Aac =Alimento aparentemente consumido y Ipc = incremento en peso corregido

- **Supervivencia (S):** Porcentaje de organismos vivos durante el tiempo de experimentación (Álvarez *et al.*, 2003; Flores, 2006).

$$S = \frac{Nf}{Ni} \times 100$$

(6)

Dónde Nf = Número final de organismos y Ni = Número inicial de organismos

Los datos generados se aproximaron a una distribución normal y se analizaron estadísticamente, los resultados obtenidos se obtuvieron por medio de una prueba de análisis de varianza de una vía (anova, $\alpha=0.05$) con la ayuda del SPSS v17.0. En caso de detección de diferencias, se determinó cuales tratamientos fueron diferentes por medio de la prueba de comparaciones múltiples de promedios de Tukey con un grado de confianza del 95%.

6.2 Análisis bioquímicos

Se realizaron las determinaciones bioquímicas de las muestras obtenidas de hepatopáncreas y hemolinfa (plasma) correspondientes a los tratamientos control restricción y crecimiento compensatorio (utilizando los promedios de cada tratamiento). En el caso de hepatopáncreas se analizaron carbohidratos (Roe *et al.*, 1961), glucosa (Barhman, 1972), colesterol (Richmond, 1973), triglicéridos (Koditschek *et al.*, 1969), lípidos (Barnes y Blackstock, 1973) y proteínas (Fujimoto *et al.*, 1985). En plasma se determinó la concentración de proteína, lactato (Shimojo *et al.*, 1989), glucosa, colesterol, triglicéridos y lípidos totales mientras que para músculo carbohidratos, glucógeno (Van Handel, 1965), lactato y proteína por medio de técnica en microplaca. Para esto, primeramente en el caso de hepatopáncreas se liofilizaron las muestras correspondientes a los tratamientos control, restricción y crecimiento compensatorio. Una vez deshidratadas, se pesaron aproximadamente 0.02 g de tejido en una balanza analítica para obtener su peso seco.

Posteriormente las muestras se pulverizaron con perlas y agitación mecánica para desintegrar el tejido con ayuda del homogeneizador Fast Prep-24, una vez hecho esto, se rehidrataron con solución salina de NaCl y se homogeneizó con ayuda de un vórtex. El extracto resultante se utilizó para las determinaciones bioquímicas mencionadas anteriormente.

En el caso de hemolinfa, las muestras correspondientes al tratamiento control, restricción y crecimiento compensatorio se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL para ser centrifugadas a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, el sobrenadante (plasma) se pasó a otro tubo y se utilizó en los análisis bioquímicos mencionados.

6.2.1 Carbohidratos totales

Previo al análisis, se tomaron 0.1 mL de homogeneizado de cada muestra y se mezclaron con 0.1 mL de Ácido TriCloroAcético (TCA) al 20% en tubos eppendorf de 0.65 mL, esto con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos. Los tubos se centrifugaron a 3,600 rpm (1376 g) por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendor 5810 R, NY-USA). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios.

Para la determinación de carbohidratos totales se siguió la metodología de Roe *et al.* (59). Se tomaron 25 µL de la muestra y se colocaron en un micro tubo donde se le agregó 250 µL de solución antrona 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%, posteriormente se calentaron a baño maría a 90°C por 10 minutos y se enfriaron en baño en hielo, se leyó su absorbancia a 620 nm con ayuda d un espectrofotómetro de placas.

6.2.2 Glucosa

La prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX método GOD-PAP, No. catalogo AY 891) se basa en la determinación de la glucosa después de la oxidación enzimática por la glucosa oxidasa. El indicador colorimétrico es la quinoneimina, la cual se genera de la 4-aminoantipirina y el fenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa.

Se tomaron 20 μ L de muestra y se colocaron en el pozo de la microplaca, se agregaron 200 μ L de solución reactiva, posteriormente se incubaron 20 minutos y se leyeron a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Termo Multiskan spectrum).

6.2.3 Lactato

El fundamento del análisis se basa en que el piruvato + peróxido de hidrógeno producto de la reacción del ácido láctico en presencia de oxígeno por medio de la lactato oxidasa, reacciona con 4-chlorofenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa produciendo quinoneimina, el cual es directamente proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra.

Para obtener dicha reacción colorimétrica se utilizó el kit de RANDOX, No. catalogo LC 2389. Se colocaron 20 μ L de muestra en los pozos de la microplaca y se agregaron 200 μ L de solución reactiva, se incubó durante 10 min y se tomó lectura a 540 nm.

6.2.4 Glucógeno

Previo al análisis, se tomaron 0.1 mL de homogeneizado de cada muestra y se mezclaron con 0.1 mL de Ácido TriCloroAcético (TCA) al 20% en tubos eppendorf de 0.65 mL, esto con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos. Los tubos se centrifugaron a 3,600 rpm (1376 g) por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Eppendor 5810 R, NY-USA). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios.

La determinación de glucógeno se realizó por medio del método de antrona para muestras pequeñas (Van Handel, 1965). Para la extracción de glucógeno del sobrenadante de TCA, se tomaron 25 μ L de sobrenadante de cada muestra, se colocaron en un micro tubo, se le agregó 500 μ L de etanol para precipitar el glucógeno. Las muestras se centrifugaron a 3600 rpm y se eliminó todo el etanol, con pipeta y evaporando en un horno-estufa (VWR-Sheldon Manufacturing 1350FM) a 70°C. Se resuspendió el glucógeno con 0.025 mL de agua destilada y posteriormente a cada tubo de muestra y de la curva tipo, se le agregaron 250 μ L de solución de antrona 0.1% diluida en H₂SO₄ al 72%. Las preparaciones anteriores se calentaron a 90°C a baño María durante 5 a 10 minutos. Por último, se enfriaron en baño de hielo, y se leyó su

absorbancia en un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan spectrum) a 620 nm.

6.2.5 Lípidos totales

El método de la sulfofosfovainillina (Barnes y Blackstock, 1973) consiste en la reacción de los lípidos con ácido sulfúrico, ácido fosfórico y vainillina para la formación de un complejo rojo. Para la determinación de los lípidos totales se tomaron 25 μL de muestra en tubos de vidrio a los cuales se les agregaron 250 μL de ácido sulfúrico concentrado, se calentaron las muestras a 90°C en baño maría por 10 min y se enfriaron en hielo. Posteriormente se colocaron 20 μL en una microplaca y se agregó solución reactiva para lípidos (fosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80%), se incubaron durante 40 min y se leyeron a 540 nm.

6.2.6 Triglicéridos

Los triglicéridos se determinaron tras hidrólisis enzimática con lipasas (kit de RANDOX, No. catalogo TR 1697). El indicador es una quinoeimina formada a partir de peróxido de hidrógeno, 4-amino-fenaxona y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa. Para esto se colocaron 20 μL de muestra en microplaca y se agregaron 200 μL de solución reactiva, posteriormente se incubaron 10 minutos y se leyeron a 540 nm.

6.2.7 Colesterol

El colesterol se determinó con el kit de RANDOX, (No. catalogo CH 200) tras una hidrólisis enzimática y una oxidación. El indicador quinoneimina se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-aminoatropina en presencia de fenol y peroxidasa. Dicha reacción se llevó a cabo colocando 25 μL de muestra en una microplaca para después agregar 200 μL de solución reactiva. Después de una incubación de 15 minutos se leyeron a 540 nm en un lector de microplaca (Thermo Scientific, Multiskan spectrum).

6.2.8 Proteínas totales

La determinación de proteínas totales se realizó por el método del Ácido Bicinonínico o BCA, se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinonínico, sal sódica (verdoso) para formar un color morado. El color formado es

proporcional al contenido proteico de la muestra. Se utiliza una solución reactiva comercial de Sigma (solución de ácido bicinconínico B9643 y solución de sulfato de cobre II C2284).

Se tomaron 25 μ L del homogeneizado y se digirió en 500 μ L de NaOH 0.1 N durante 120 minutos, posteriormente se tomaron 25 μ L del digerido el cual se colocó en el fondo de una microplaca y se le agregó el reactivo preparado de BCA. Posteriormente se incubó a 60°C durante 15 minutos y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo Multiskan spectrum) a 562 nm.

Se analizaron estadísticamente los resultados derivados de los análisis bioquímicos por medio de pruebas de análisis de varianza de una vía (anova $\alpha=0.05$) con la ayuda del SPSS v17.0 para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. En caso de detección de diferencias, se determinó cuales tratamientos fueron diferentes por medio de la prueba de comparaciones múltiples de promedios de Tukey con un grado de confianza del 95%.

6.3 Análisis de expresión diferencial

6.3.1 Procesamiento de ARN

Se realizó la extracción de ARN siguiendo la metodología de Chomczynski y Sacchi (1987) utilizando una solución de TRIzol (invitrogen) para muestras de músculo de organismos del tratamiento control a los 14 y 21 días del experimento (Ref14 y Ref21 respectivamente), además de organismos del tratamiento R7 (CC) a los 14 días de experimentación (7 días de restricción y 7 días de realimentación) tomado como crecimiento compensatorio. Una vez extraído se cuantificó por fluorometría en Qubit (invitrogen) y evaluó su integridad en NanoDrop y gel de agarosa.

El ARN fue secuenciado en una plataforma Novaseq de illumina secuenciando 3 librerías por tratamiento (pools de 2 camarones cada una) con una profundidad de 30 millones de lecturas 2x100 pb.

6.3.2 Análisis bioinformático

La calidad de las secuencias (Q>30) se verificaron con el programa FastQC versión 0.11.7 (Andrews *et al.*, 2011), identificando los adaptadores usados en la secuenciación

y delimitado los parámetros a considerar para la limpieza. Se utilizó el programa Fastp (Chen *et al.*, 2018) para eliminar los adaptadores, y las lecturas que no cumplieran con las especificaciones de calidad.

Utilizando el programa HISAT2 v2.2.1 (Kim *et al.* 2015) se alinearon las lecturas restantes de cada tratamiento al genoma de referencia de *Penaeus vannamei* ASM378908v1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_003789085.1/), una vez realizado el alineamiento, se realizó el ensamblaje y cuantificación de genes y transcritos expresados en cada muestra utilizando el programa StringTie 1.3.4 (Pertea *et al.*, 2016). Posteriormente con Gffcompare 0.11.5 (Pertea y Pertea, 2020) se compararon los genes y transcritos con la anotación de referencia, una vez obtenidos los datos estadísticos se estimaron las abundancias de los transcritos y se crearon recuentos de tablas para cada muestra con ayuda del programa stringtie 2.1.1 (Pertea *et al.*, 2016). Para determinar los genes y transcritos expresados diferencialmente entre tratamientos se empleó el paquete Bioconductor R DESeq2 v1.22.2 (Love *et al.*, 2014) basado en un modelo que utiliza la distribución binomial negativa haciendo la comparación control (Ref14 y Ref21) *versus* crecimiento compensatorio (CC).

El análisis de anotación de ontología génica (GO) se realizó utilizando el módulo Blast2GO de OmicsBox v1.3 (Gotz *et al.*, 2008) (<https://www.biobam.com/>). Las secuencias de nucleótidos de los genes expresados diferencialmente se convirtieron en secuencias de aminoácidos usando la herramienta de análisis EMBOSS Transeq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) (Madeira *et al.*, 2019) y la categorización funcional se realizó mediante la comparación de secuencias de aminoácidos con la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) utilizando la herramienta web blastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del rendimiento productivo de *P. vannamei* sometido a diferentes periodos de restricción alimenticia

En la figura 5 se presenta el crecimiento de los camarones bajo los diferentes tratamientos. A partir de la biometría del día 14, no se observan diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento R7 (7 días después de la realimentación). Para el caso del tratamiento R14, se observó un crecimiento compensatorio completo al día 49 de cultivo. En el caso del tratamiento R21, no hubo un crecimiento compensatorio al final del tiempo experimental.

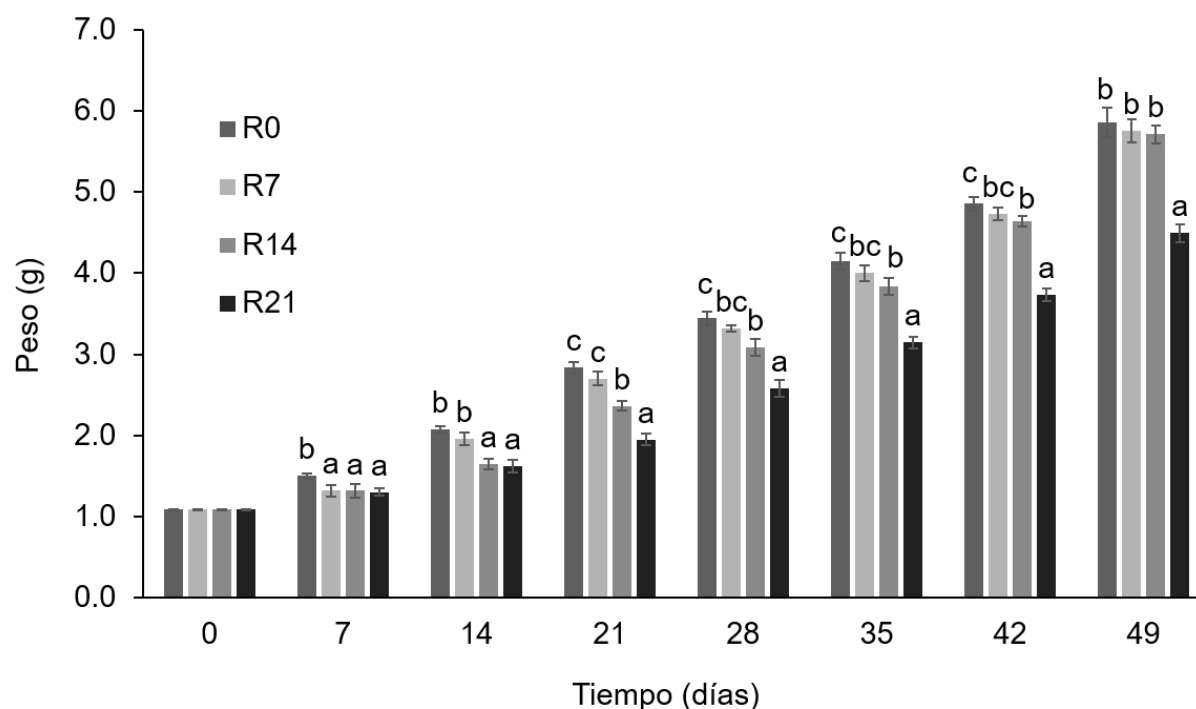


Figura 5. Peso promedio de *P. vannamei* a los diferentes tiempos experimentales en los tratamientos R0, R7, R14 y R21 ($p < 0.05$, $n=3$).

Respecto a los parámetros zootécnicos relacionados al crecimiento del camarón blanco del Pacífico *P. vannamei* al final del experimento (Tabla III), los organismos con el mayor peso promedio final fueron los pertenecientes al tratamiento control; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas en ninguno de los parámetros

analizados con respecto a los tratamientos R7 Y R14. El único tratamiento con el cual se encontraron diferencias significativas fue con R21 ($p<0.05$), el cual obtuvo el menor peso promedio final, tasa de crecimiento y tasa de crecimiento específica. En cuanto a supervivencia, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla III. Parámetros zootécnicos de camarones después de 49 días de experimentación, sometidos a restricción parcial de alimento (50%) durante 0, 7, 14 y 21 días.

Tratamiento	PF (g)	TC (%)	TCE (% día ⁻¹)	Supervivencia (%)
R0	5.86±0.18 ^b	437±16 ^b	3.43±0.06 ^b	89±5
R7	5.75±0.14 ^b	428±13 ^b	3.39±0.05 ^b	86±5
R14	5.71±0.12 ^b	424±11 ^b	3.38±0.04 ^b	86±5
R21	4.49±0.12 ^a	312±10 ^a	2.89±0.05 ^a	80±5
Valor p	<0.001	<0.001	<0.001	0.278

Los valores representan promedios ± desv est. (n=3). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas, de acuerdo a un análisis de Tukey ($p<0.05$).

El tratamiento control obtuvo el mayor crecimiento, con una ganancia en peso de 4.77 g, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos de R7 y R14 (4.66 g y 4.62 g respectivamente) (Fig. 6). La ganancia en peso de los camarones sometidos a restricción alimenticia durante 21 días fue significativamente menor comparada al resto de los tratamientos con 3.40 g.

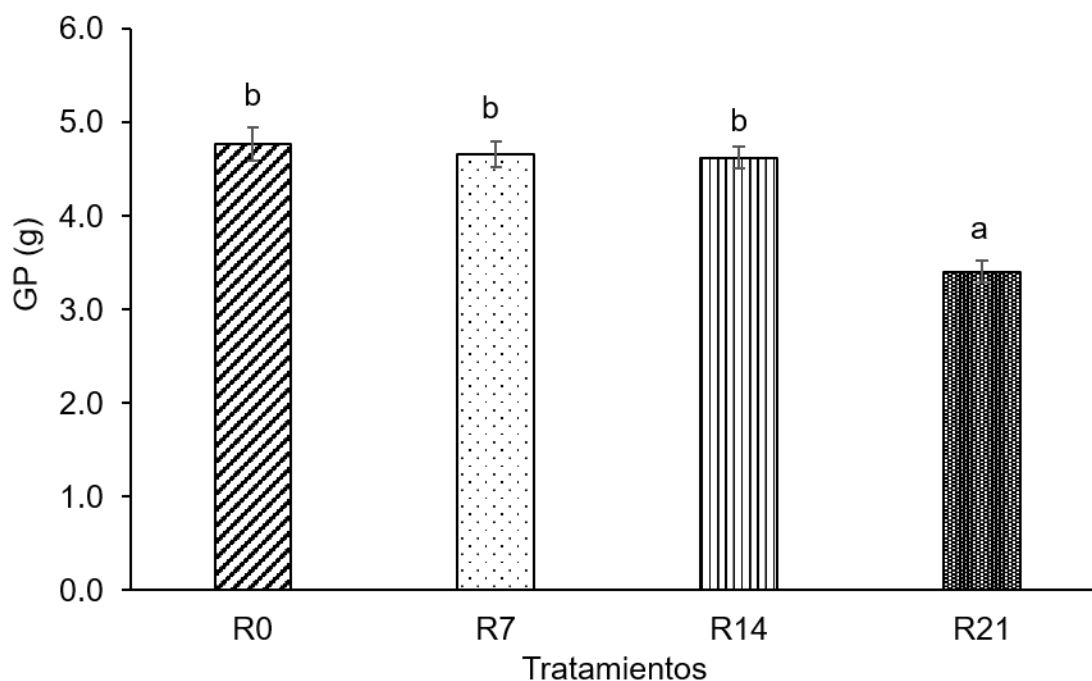


Figura 6. Promedio final de ganancia en peso por tratamiento expresada en gramos. Letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo a un análisis de Tukey ($n=3$, $p<0.05$).

Con respecto al consumo individual de alimento (Fig. 7), se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos ($p<0.001$), siendo el tratamiento control el de mayor consumo de alimento con un valor de 8.70 g seguido de los tratamientos de R7 y R14, con 7.87 y 7.29 g respectivamente. Los camarones del tratamiento R21 presentaron el menor consumo promedio individual (5.71 g).

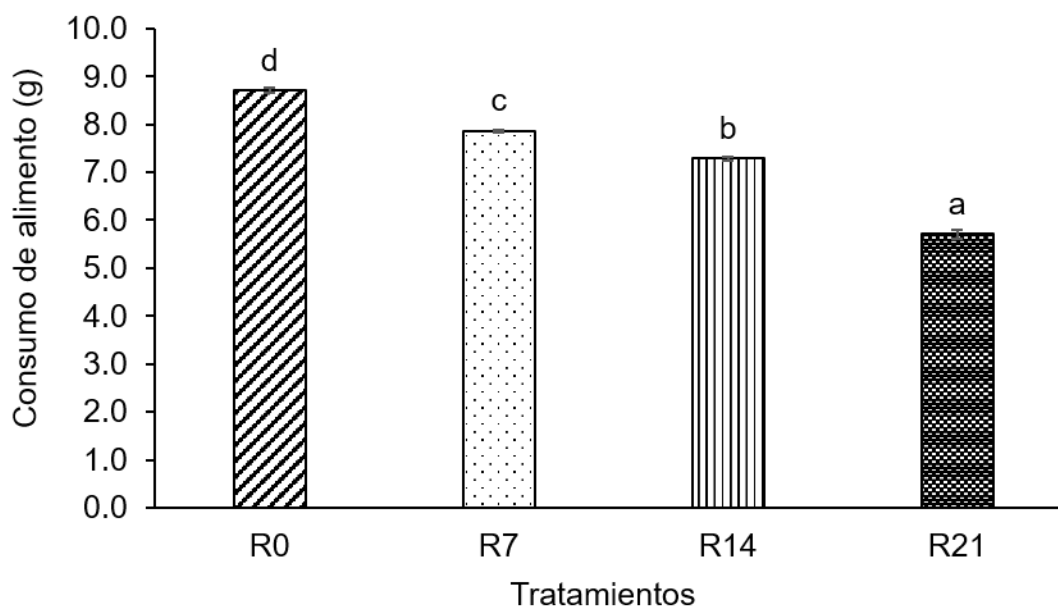


Figura 7. Consumo individual total en gramos de cada uno de los tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo a un análisis de Tukey ($n=3$, $p < 0.05$).

En cuanto al factor de conversión alimenticia, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos R14 y R21 con respecto al tratamiento control. El FCA más elevado lo obtuvo el tratamiento control (R0) con 1.83, mientras que el que presentó mejor eficiencia en utilización de alimento en términos de FCA fue el tratamiento R14 con 1.58 (Fig. 8).

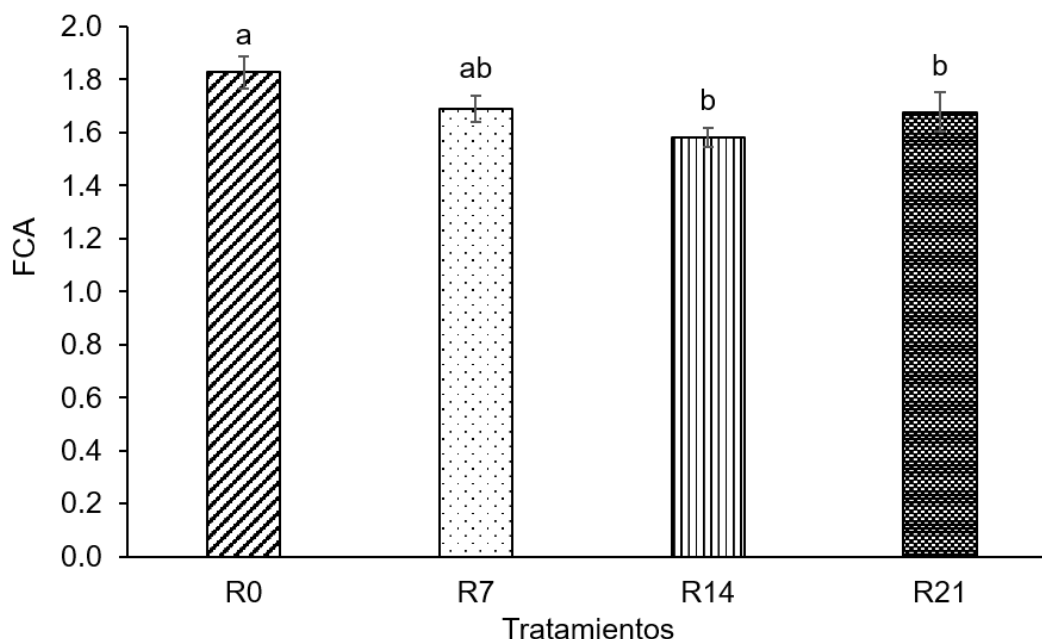


Figura 8. Factor de conversión alimenticia de los tratamientos experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas, de acuerdo a un análisis de Tukey ($n=3$, $p<0.05$).

7.1.1 Tasa de crecimiento específica a los 7 días post realimentación

Al hacer una comparación entre el tratamiento control y los tratamientos experimentales 7 días después de la realimentación, se puede observar que después de este tiempo los camarones restringidos del 50% del alimento tienen un mayor crecimiento específico (por día).

A los 14 días del ensayo se observó una mayor TCE en el tratamiento R7 ($5.63\% \text{ día}^{-1}$) respecto al control ($4.63\% \text{ día}^{-1}$), es decir que después de 7 días de realimentación presentó una tasa de crecimiento acelerada para dar pie al proceso de crecimiento compensatorio. En el caso de los tratamientos R14 y R21 mantuvieron una TCE significativamente menor debido a la continua restricción de alimento (3.19 y $3.09\% \text{ día}^{-1}$ respectivamente) (Fig. 9).

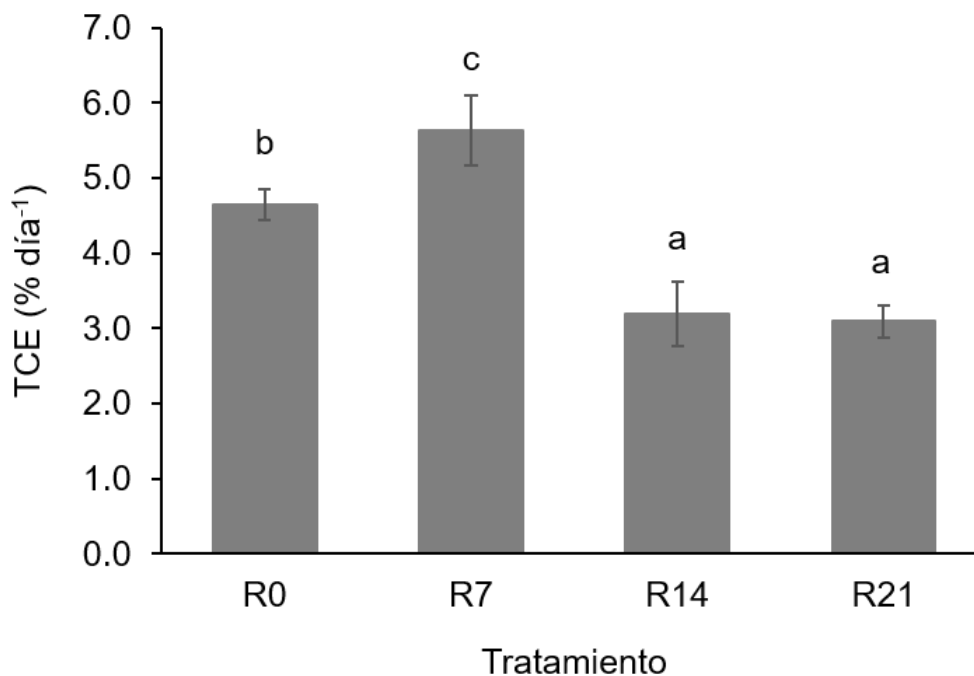


Figura 9. Tasa de crecimiento específica entre el día 7 y 14 de experimentación (para el tratamiento R7 a los 7 días post realimentación) ($n=3$, $p<0.05$).

De igual forma se observó un incremento de la TCE en el tratamiento R14, 7 días después de iniciado el periodo de realimentación ($5.17\% \text{ día}^{-1}$), es decir a los 21 días del ensayo, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con los tratamientos control ($4.43\% \text{ día}^{-1}$) y R7 ($4.57\% \text{ día}^{-1}$). El valor más bajo de TCE durante este tiempo se observó en el tratamiento R21 debido a que se encontraba durante la fase de restricción alimenticia ($2.63\% \text{ día}^{-1}$) (Fig. 10).

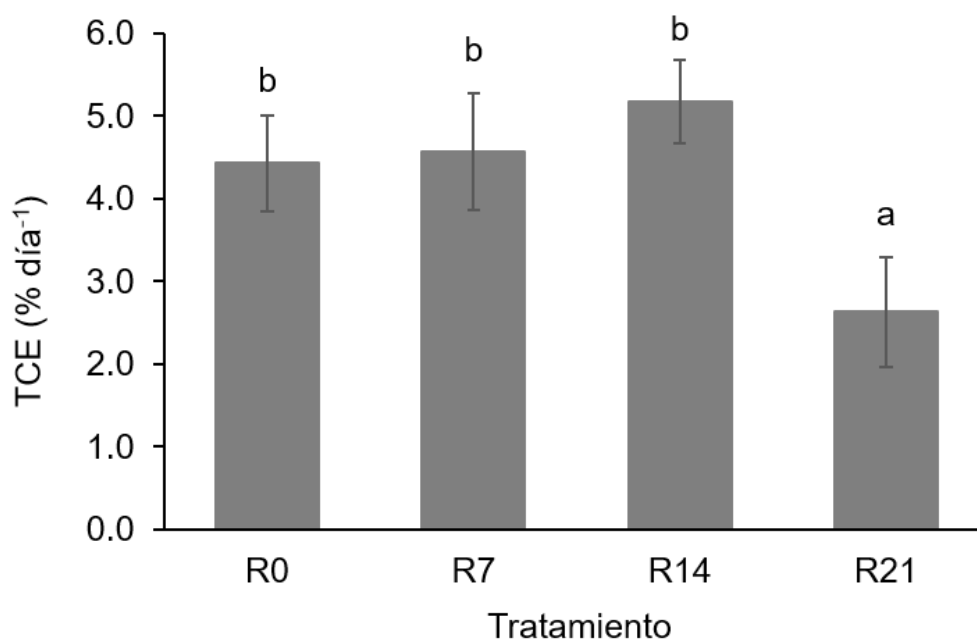


Figura 10. Tasa de crecimiento específica entre el día 14 y 21 de experimentación (para el tratamiento R14 a los 7 días post realimentación) ($n=3$, $p<0.05$).

Siguiendo la misma tendencia, el tratamiento R21 presentó la mayor TCE a los 7 días post realimentación (4.02% día⁻¹), sin embargo, no presentó diferencias significativas ($p>0.05$) respecto a los demás tratamientos experimentales (2.8 a 3.8% día⁻¹) (Fig. 11).

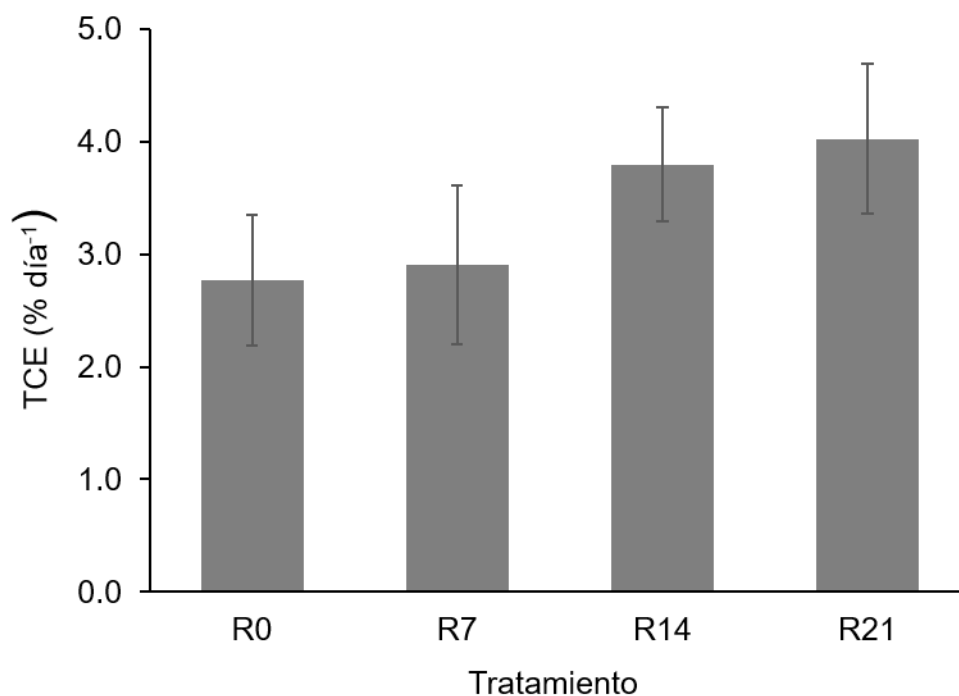


Figura 11. Tasa de crecimiento específica entre el día 21 y 28 de experimentación (para el tratamiento R21 a los 7 días post realimentación) (n=3).

7.2 Análisis bioquímicos

De acuerdo a los datos pertenecientes al análisis de composición bioquímica de hepatopáncreas de camarones sometidos a los tratamientos control, restricción y crecimiento compensatorio (promedios por condición), no se encontraron diferencias significativas para el contenido de glucógeno, colesterol, lípidos totales y proteína total ($p>0.05$). En cuanto a carbohidratos totales y triglicéridos, se encontraron diferencias significativas en el tratamiento de crecimiento compensatorio respecto al control (Tabla IV).

Tabla IV. Composición bioquímica de hepatopáncreas de *Penaeus vannamei* en los periodos de alimentación *ad libitum*, restricción y realimentación (crecimiento compensatorio).

	Control	Restricción	Crecimiento compensatorio	Valor <i>p</i>
Carbohidratos totales (mg/g)	45.6±1.2 ^{ab}	38.2±3.6 ^a	52.6±1.2 ^b	0.011
Glucógeno (mg/g)	4.4±1.5 ^a	5.2±0.8 ^a	5.2±1.2 ^a	0.725
Triglicéridos (mg/g)	199.9±35.8 ^a	156.1±28.9 ^a	134.3±15.7 ^a	0.158
Colesterol (mg/g)	6.1±4.1 ^a	3.6±0.1 ^a	3.3±1.1 ^a	0.253
Lípidos Totales (mg/g)	408.4±29.4 ^b	378.6±24.3 ^{ab}	334.9±8.9 ^a	0.004
Proteína total (mg/g)	352.4±29.8 ^a	343.5±57.9 ^a	469.2±60.6 ^a	0.043

Los valores representan promedios ± desv estandar. Letras diferentes en las líneas indican diferencias significativas, de acuerdo a un análisis de Tukey ($p < 0.05$).

En cuanto a la composición bioquímica del plasma de *P. vannamei*, se encontraron diferencias significativas en lípidos totales entre las 3 condiciones; en triglicéridos se encontró que existen diferencias significativas entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio, mientras que en glucosa, lactato colesterol y proteína total no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla V).

Tabla V. Composición bioquímica de plasma de *Penaeus vannamei* en los periodos de alimentación *ad libitum*, restricción y realimentación (crecimiento compensatorio).

	Control	Restricción	Crecimiento compensatorio	Valor <i>p</i>
Glucosa (mg/mL)	0.16±0.05 ^a	0.14±0.02 ^a	0.16±0.03 ^a	0.802
Lactato (mg/mL)	0.08±0.02 ^a	0.07±0.01 ^a	0.096±0.03 ^a	0.589
Lípidos Totales (mg/mL)	3.51±1.12 ^{ab}	2.38±0.32 ^a	5.69±1.33 ^b	0.020
Triglicéridos (mg/mL)	0.81±0.13 ^b	0.47±0.04 ^a	1.03±0.05 ^b	0.004
Colesterol (mg/mL)	0.30±0.06 ^a	0.30±0.009 ^a	0.31±0.04 ^a	0.948
Proteína Total (mg/mL)	56.87±3.13 ^a	59.67±1.50 ^a	55.94±3.43 ^a	0.448

Los valores representan promedios ± desv estandar. Letras diferentes en las líneas indican diferencias significativas, de acuerdo a un análisis de Tukey ($p < 0.05$).

7.3 Análisis bioinformático

7.3.1 Limpieza de lecturas

Las secuencias correspondientes al periodo de alimentación *ad libitum* y realimentación (crecimiento compensatorio) cumplieron con las especificaciones de calidad posterior a la limpieza realizada con el programa fastp ($Q > 30$) obteniendo una longitud media de 134 pb (Fig. 12).

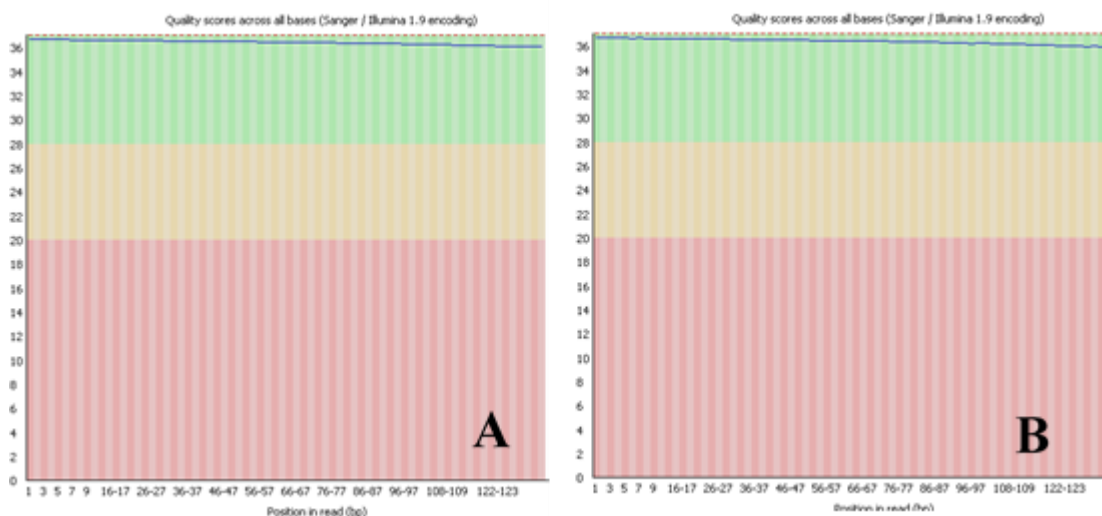


Figura 12. Calidad de lecturas correspondientes al tratamiento control (Ar0_21a). Forward (A) y Reverse (B) en donde el eje "X" representa la posición de los nucleótidos en pares de bases y el eje "Y" el valor de Q.

7.4 Análisis de expresión diferencial

7.4.1 Análisis de componentes principales (PCA)

Mediante el PCA se lograron caracterizar 3 clusters de acuerdo a la estimación de la expresión génica (FPKM + 1) generándose 2 componentes principales que explicaron el 60% de la variación en el total de datos, siendo el componente principal 1 (CP1) el 43% y el componente principal 2 (CP2) el 17% de la varianza (Fig. 13).

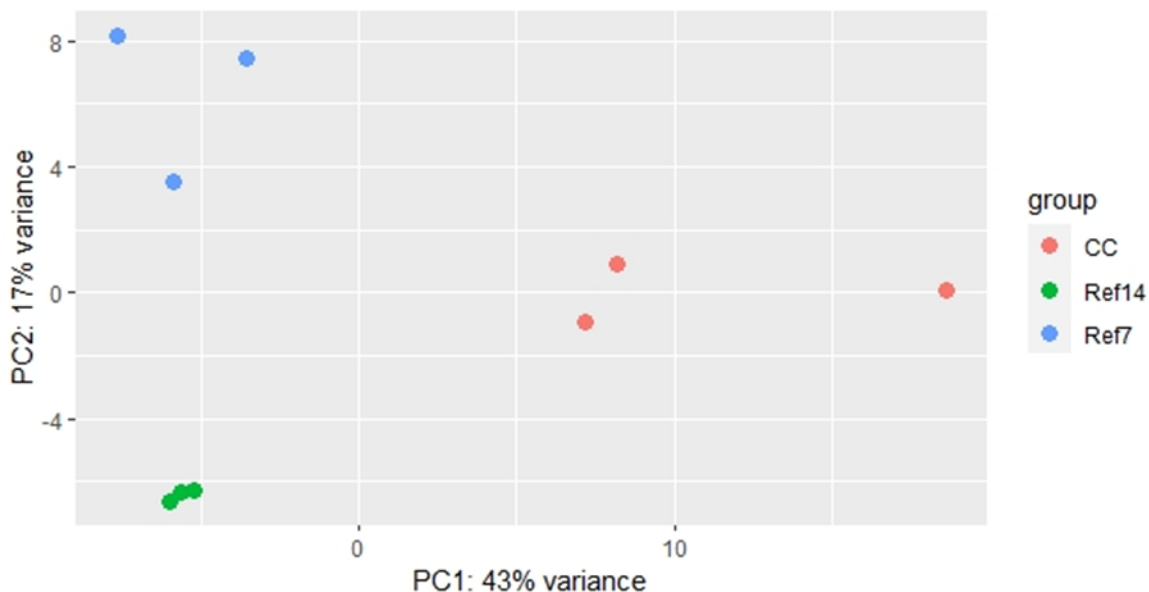


Figura 13. Análisis de componentes principales de la expresión génica por tratamiento.

De acuerdo al análisis de expresión diferencial realizado con el paquete Deseq2, se encontraron 276 genes expresados diferencialmente ($FC > 1.5$, $p < 0.05$), de los cuales se lograron anotar 109: 28 sobre-expresados y 81 sub-expresados entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio. La figura 14 muestra la agrupación de dichos genes por clusters con expresión similar, donde las filas representan cada gen y las columnas las réplicas para cada tratamiento, asignando un color rojo al mayor nivel de expresión y azul al menor nivel de expresión.

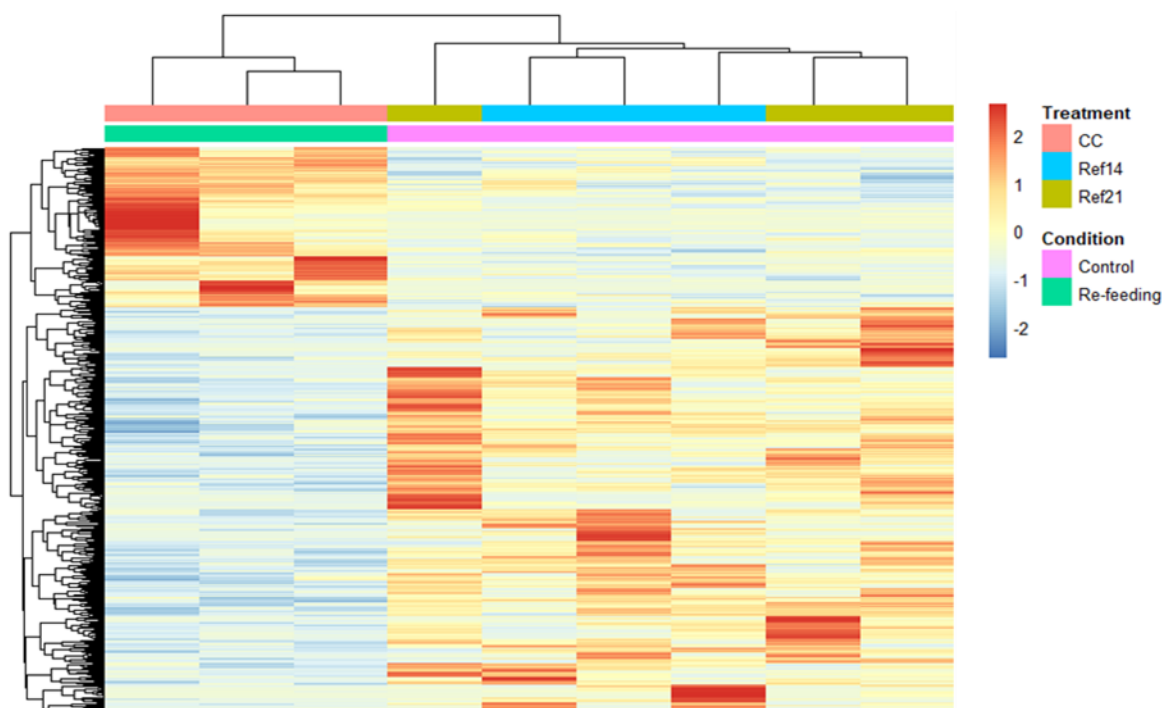


Figura 14. Agrupamiento de librerías en relación a los genes sobre-expresados y sub-expresados entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio.

7.4.2 Genes sobre expresados

De los 28 genes sobre expresados durante el crecimiento compensatorio respecto a los tratamientos control, destacan genes involucrados en el metabolismo energético (lípidos y aminoácidos glucogénicos), biotransformación de compuestos endógenos producto del estrés oxidativo, desarrollo y contracción muscular y proceso de muda (componentes de la cutícula) (Tabla VI).

Tabla VI. Genes sobre expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control.

Gen	Fold change	Valor p	Función
Pirofosfatasa /fosfodiesterasa 6	1.79	0.013	Hidrólisis de compuestos de colina
Serina deshidratasa	1.59	0.004	Catabolismo del aminoácido serina
Serina racemasa	1.71	0.044	Catabolismo de aminoácido serina
Transportador de amonio Rh tipo A	2.88	0.001	Transporte transmembrana de amonio
UDP-glucuronosiltransferasa 2B10	2.91	0.012	Biotransformación de compuestos endógenos producto de estrés oxidativo
Citocromo P450 2L1	5.90	0.040	Biotransformación de compuestos endógenos de estrés oxidativo
Actina T2	1.66	0.001	Desarrollo del músculo y contracción muscular
Quitinasa 2	1.75	0.014	Hidrólisis de quitina durante la pre-muda
Proteína de la cutícula pupal 36	5.67	0.012	Componente estructural de la cutícula
Proteína de cutícula AMP1A	7.83	0.000	Componente estructural de la cutícula

7.4.3 Genes sub expresados

De los 81 genes sub expresados durante el crecimiento compensatorio en comparación con los tratamientos control, se muestran en la Tabla VII los de mayor interés, entre los que se encuentran genes relacionados al metabolismo de carbohidratos y sistema inmune de *P. vannamei*

Tabla VII. Genes sub expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control.

Gen	Fold change	Valor p	Función
Triosafosfato isomerasa	4.00	0.045	Biosíntesis de carbohidratos en gluconeogénesis y síntesis de D-gliceraldehído 3-fosfato en glucólisis
Glicoproteína-N-acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferasa 1	6.43	0.000	Biosíntesis de O-glicosilación del tipo de mucina
Proteína de choque térmico 21	1.77	0.012	Respuesta a los patógenos y condiciones estresantes
Carbohidrato sulfotransferasa 11	2.75	0.042	Respuesta a los patógenos
E3 ubiquitina-proteína ligasa TRAIP	2.14	0.013	Respuesta a los patógenos

7.5 Ontología de genes (GO terms)

A los genes expresados diferencialmente que se lograron anotar se les asignaron categorías de ontología génica con ayuda del programa Blast2GO de OmicsBox v1.3 (Gotz *et al.*, 2008). Como resultado se encontró que estos corresponden a: 58 procesos biológicos, 27 componentes celulares y 63 funciones moleculares.

El proceso biológico con mayor porcentaje de genes fue el proceso metabólico de macromoléculas celulares (GO: 0044260, 33.77%). Esto incluye reacciones químicas y vías que implican cualquier molécula de alta masa molecular relativa, cuya estructura consiste esencialmente en la repetición múltiple de unidades derivadas, real o conceptualmente, de moléculas de baja masa molecular relativa, sintetizadas por células individuales (Fig. 15).

Seguido de este, los procesos biológicos con un porcentaje de genes expresados diferencialmente, fueron los correspondientes a la organización de componentes celulares (GO: 0016043, 10.39%), los cuales forman parte del proceso que resulta en el ensamblaje, la disposición de las partes constituyentes o el desmontaje de un componente celular y la regulación del proceso celular (GO: 0050794, 9.09%) que incluye cualquier proceso que modula la frecuencia, velocidad o extensión de un proceso a nivel celular, pero no están necesariamente restringidos a una sola célula (Fig. 15).

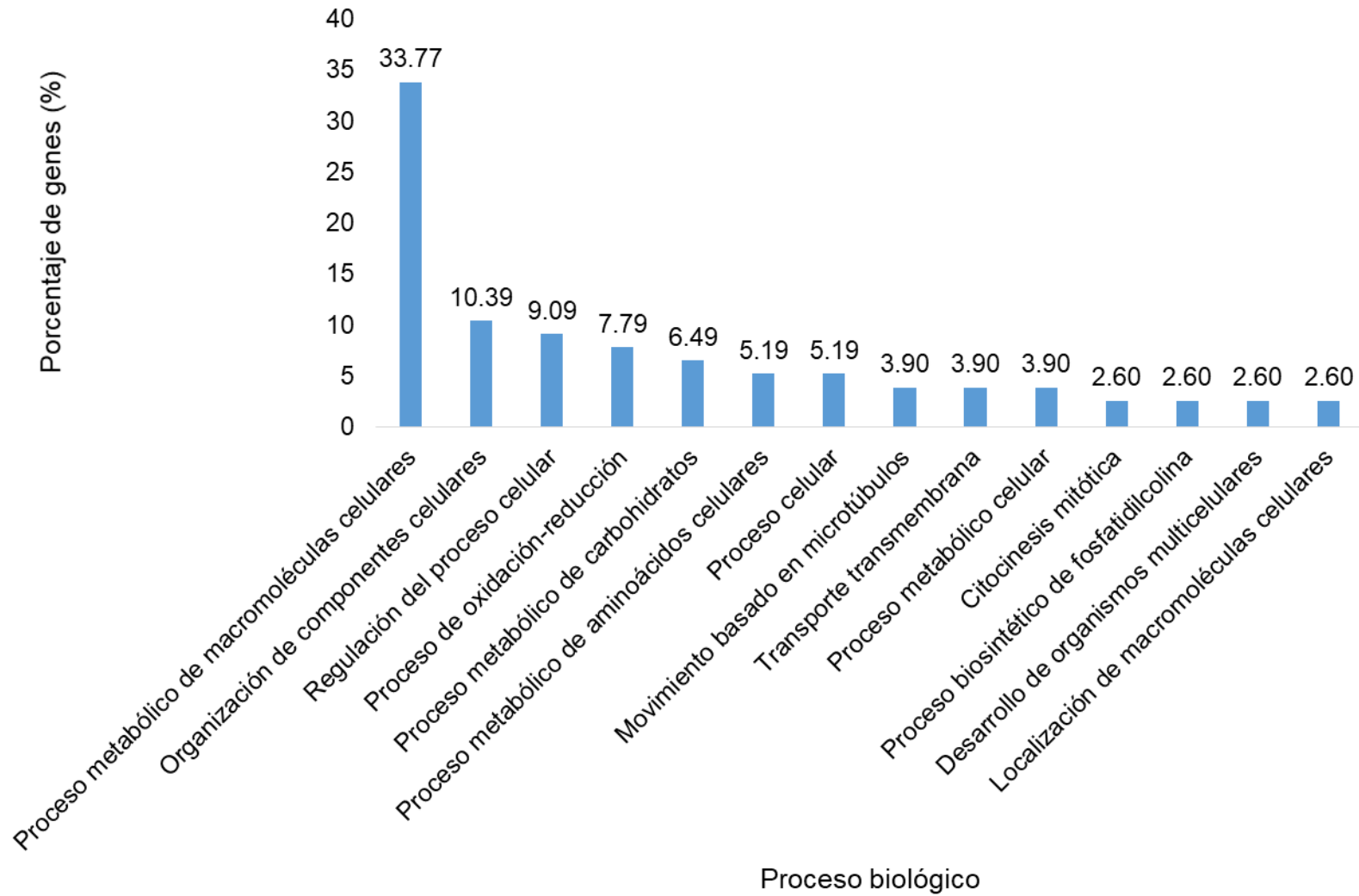


Figura 15. Porcentaje de genes expresados diferencialmente entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio asociados a procesos biológicos de acuerdo a la clasificación GO (Gene Ontology).

Como se muestra en la figura 16, la función molecular con el mayor porcentaje de genes expresados diferencialmente fue la actividad catalítica (GO: 0003824, 33.66%) refiriéndose a la catálisis de una reacción bioquímica a temperaturas fisiológicas, seguido de enlace de ácido nucleico (GO: 0003676, 15.84%). Las funciones moleculares unión de ATP (GO: 0005524), unión (GO: 0005488) y unión de iones (GO: 0043167) presentaron el mismo porcentaje de genes asociados (10.89%).

De acuerdo al componente celular, el 20.59% de los genes expresados diferencialmente corresponden a la categoría componente integral de la membrana (GO:0016021), la cual consiste en los productos de genes y complejos de proteínas que tienen al menos alguna parte de su secuencia peptídica incrustada en la región hidrofóbica de la membrana, seguido de las categorías asociadas a núcleo (GO: 0005634, 14.71%), entidad anatómica celular (GO: 0110165) y citoplasma (GO: 0005737) con un porcentaje de genes asociados de 13.24% (Fig. 17).

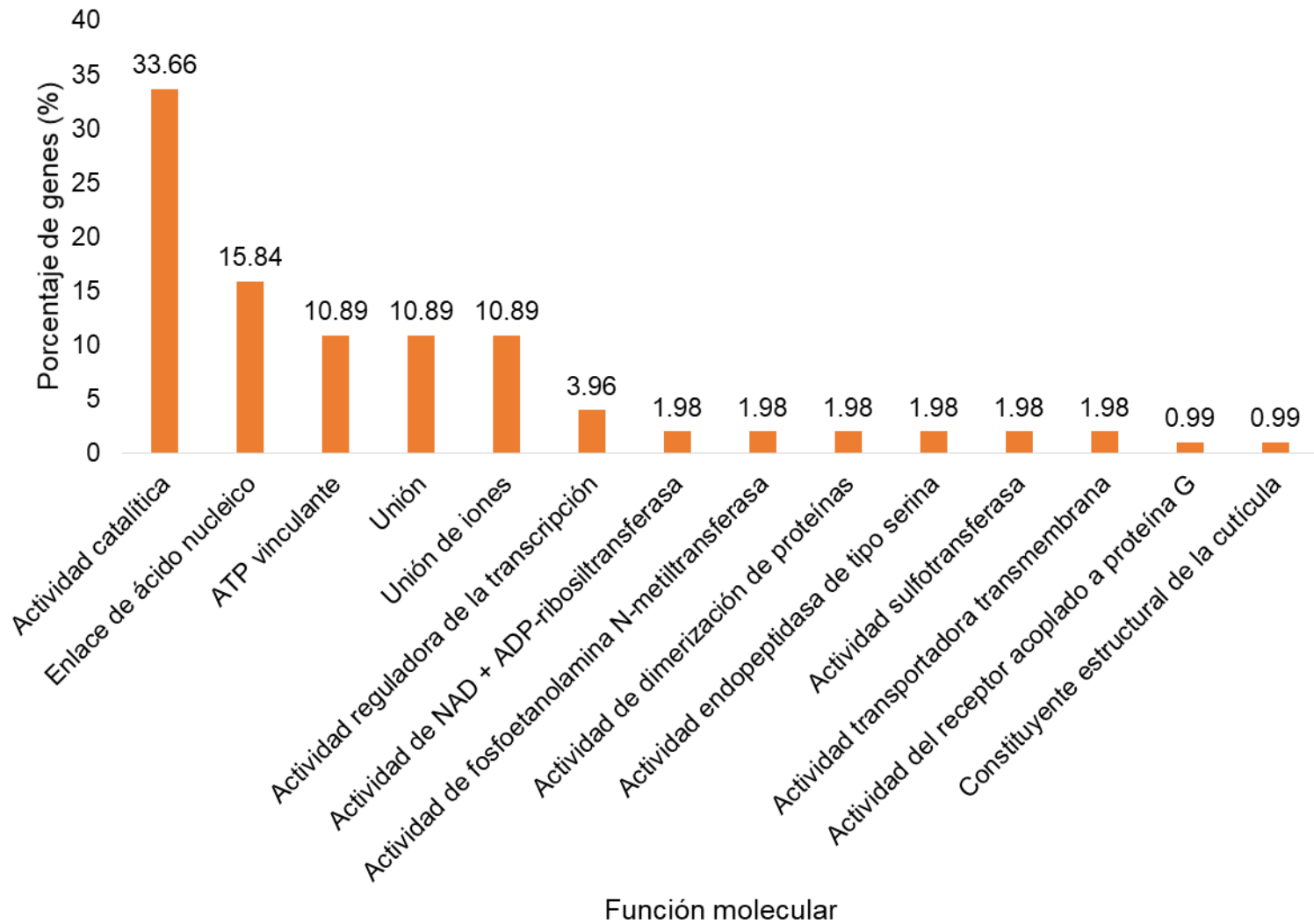


Figura 16. Porcentaje de genes expresados diferencialmente entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio asociados a funciones moleculares de acuerdo a la clasificación GO (Gene Ontology).

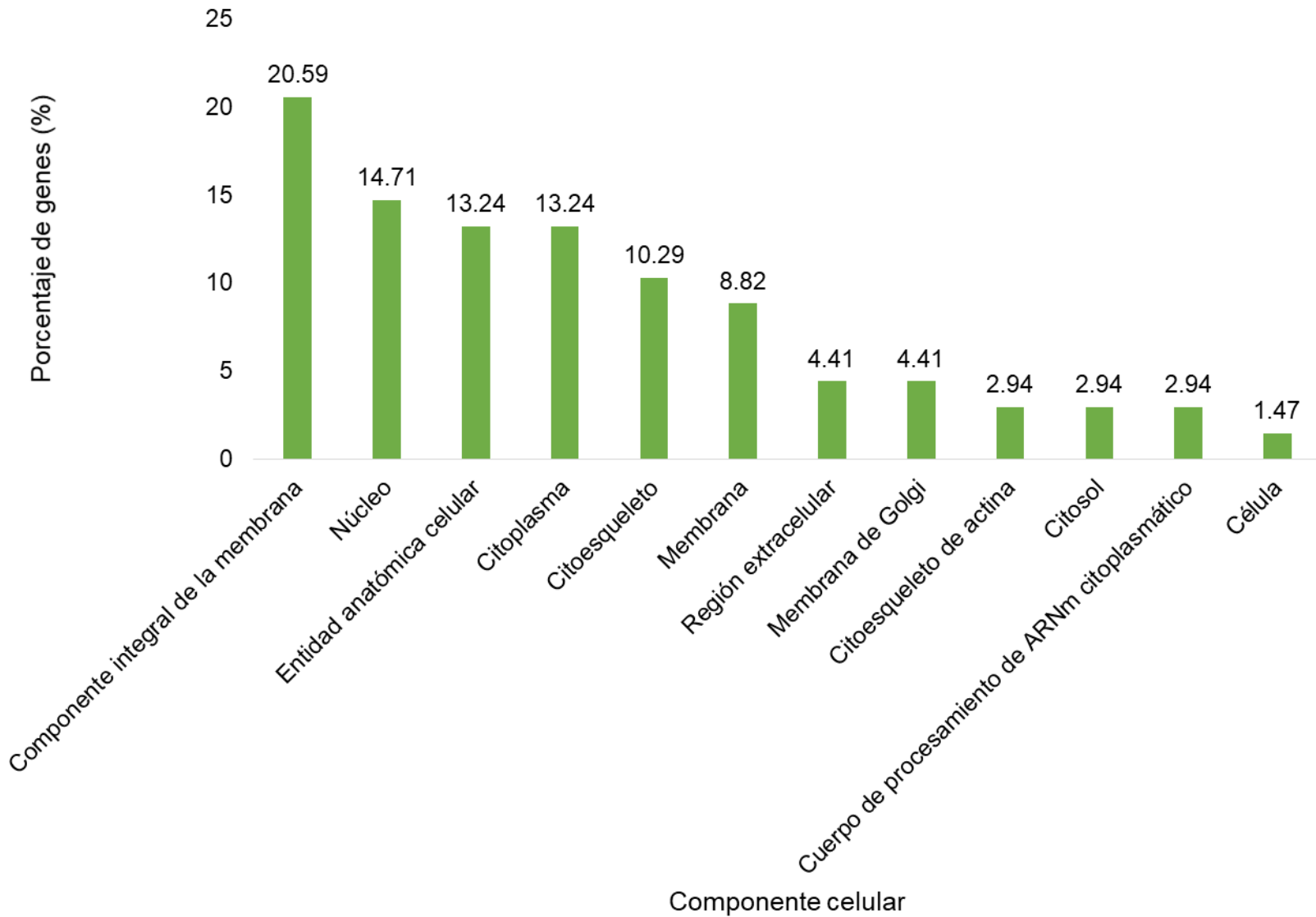


Figura 17. Porcentaje de genes expresados diferencialmente entre los tratamientos control y crecimiento compensatorio asociados a componentes celulares de acuerdo a la clasificación GO (Gene Ontology).

7.6 Anotación funcional de rutas metabólicas en KEGG

Se obtuvo una anotación funcional del 59.3% de las secuencias ingresadas correspondientes a los genes sobre-expresados. El 32% de estas corresponden a familias de proteínas cuya función es el procesamiento de información genética (ko09120), donde predominan los factores de transcripción (ko03000), seguido de rutas encargadas del metabolismo tales como metabolismo de aminoácidos (ko09105, 19%) siendo el metabolismo de glicina, serina y treonina (ko00260) la categoría con más genes y de lípidos (ko09103, 13%) con genes involucrados en las rutas de metabolismo de lípidos de éter (ko00565), ácido araquidónico (ko00590) y ácido linoleico (ko00591) (Fig. 18).

En cuanto a los genes sub-expresados se obtuvo una anotación funcional del 41.2 %, donde las categorías predominantes fueron familias de proteínas asociadas a proceso de información genética y proteínas asociadas a metabolismo (ko09120, 21%), biosíntesis y metabolismo de glicanos (ko09107, 9%), familias de proteínas asociadas al metabolismo (ko09181, 9%) siendo la categoría de enzimas (ko01000) la que presentó mayor número de genes y sistemas orgánicos (ko09150) con el 9% de genes cada una (Fig. 19).

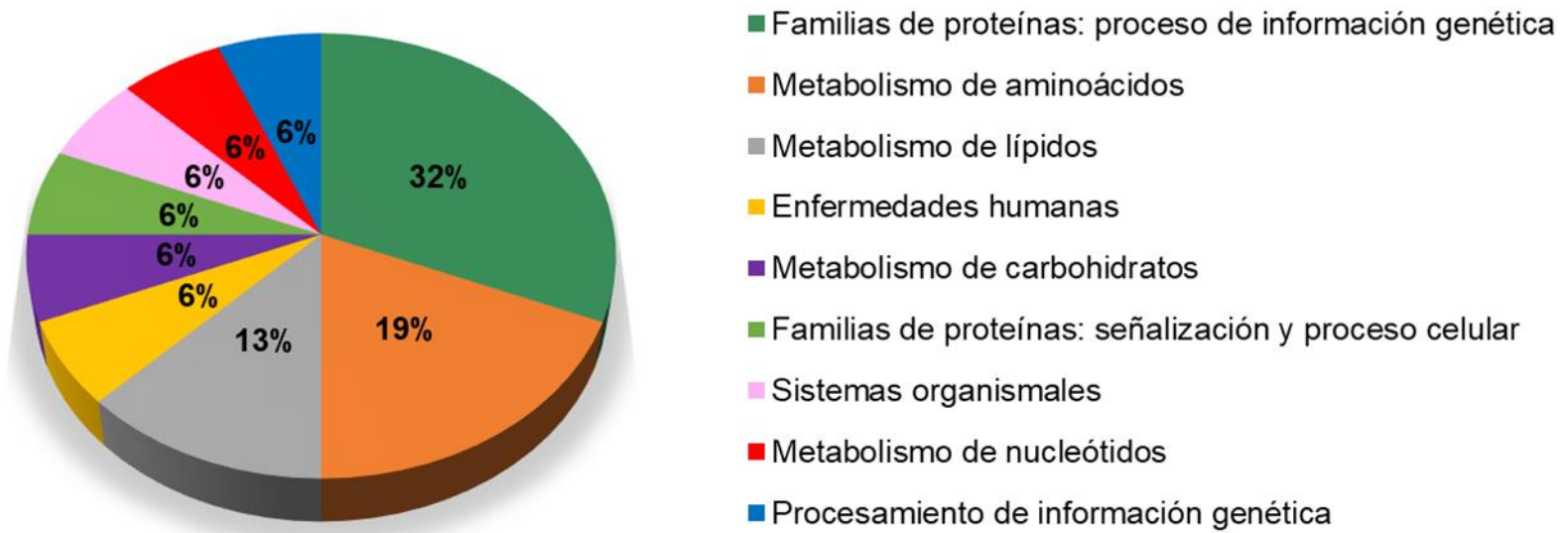


Figura 18. Rutas metabólicas asociadas a genes sobre expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control de acuerdo a la clasificación KEGG.

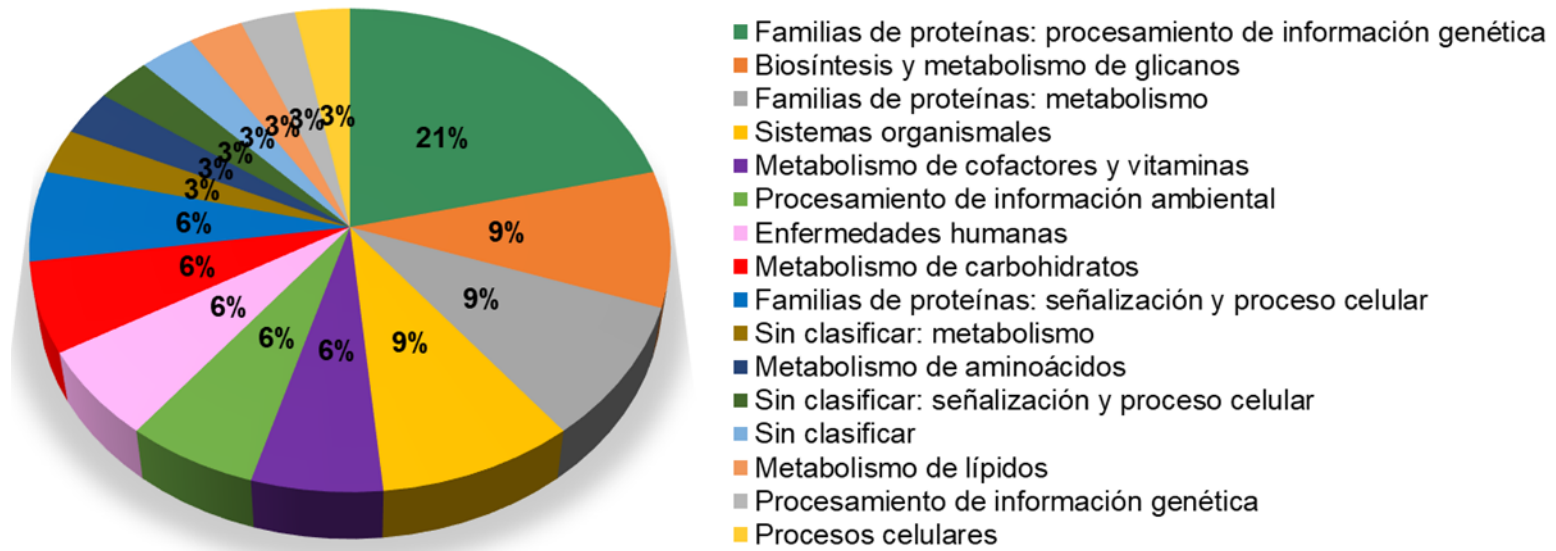


Figura 19. Rutas metabólicas asociadas a genes sub expresados durante el crecimiento compensatorio respecto al tratamiento control de acuerdo a la clasificación KEGG.

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación del rendimiento productivo de *P. vannamei* sometido a diferentes tratamientos de restricción alimenticia

Los resultados del bioensayo de restricción alimenticia indican que los camarones bajo restricción del 50% de alimento por 7 y 14 días seguido de un periodo de realimentación a saciedad o *ad libitum*, presentan un crecimiento compensatorio completo a los 49 días de ensayo. Estos organismos lograron alcanzar tallas similares a las de camarones alimentados a saciedad (R0, control), no encontrando diferencias significativas ($p>0.05$) entre dichos tratamientos en términos de peso final, tasa de crecimiento y tasa de crecimiento específica. Las anteriores observaciones concuerdan con diversos estudios como el de Zhu *et al.* (2016) donde reportan la capacidad de crecimiento compensatorio completo en *P. vannamei* después de ser sometidos a una alimentación cíclica con periodos cortos de ayuno (1 a 3 días) seguidos de un periodo de realimentación. De igual manera Wu y Dong (2002) observaron esta misma capacidad en la especie *Fenneropenaeus chinensis* al ser sometidos a 6 días de ayuno y 30 de realimentación.

Adicionalmente, estos últimos autores en el mismo trabajo, encontraron una mayor tasa de crecimiento específica 7 días después de iniciado el periodo de realimentación, es decir entre los 12 y 18 días del experimento. Lo anterior concuerda con lo observado en el presente trabajo, pues se obtuvo una mayor tasa de crecimiento a los 7 días post realimentación en todos los tratamientos experimentales; a los 14 días en el tratamiento R7, a los 21 días en el tratamiento R14 y a los 28 días en el tratamiento R21, atribuido a el proceso de crecimiento compensatorio.

Después de cada periodo de restricción alimenticia, los tratamientos experimentales presentaron periodos variables de hiperfagia, es decir un aumento en la tasa de consumo de alimento. Aparentemente, el crecimiento compensatorio contribuye en cierta medida a una mayor frecuencia de ecdisis por hiperfagia después de períodos de restricción alimenticia, pues este proceso ha sido observado en diversas especies de peces y crustáceos como *Oreochromis niloticus*, *Cherax quadricarinatus*, *F. chinensis* y *P. vannamei* (Arauco y Costa, 2012; Stumpf y López-Greco, 2015; Wu *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2018).

Por otra parte, se encontró que, debido a los periodos de restricción, existe una reducción de hasta el 14.67% del consumo total de alimento, con lo cual se puede lograr una disminución en los costos de alimentación. Esto concuerda con lo reportado por Foes *et al.* (2016), así como Maciel *et al.* (2018) donde afirman que la restricción de alimento temporal que induce el crecimiento compensatorio en camarones ha demostrado ser una técnica que permite un ahorro de alrededor del 25% en el uso de alimentos para la producción de camarones.

Teniendo en cuenta que a partir de la restricción alimenticia parcial seguida de un periodo de realimentación se obtiene una disminución en el uso de alimento al final del cultivo, la aplicación de ciclos de restricción y realimentación como estrategia de alimentación a lo largo del tiempo de cultivo de estos organismos, permitiría un mayor ahorro de alimento. En este sentido, Stumpf *et al.* (2014) obtuvieron un crecimiento compensatorio total en la especie *C. quadricarinatus* y una reducción del consumo de alimento al finalizar el bioensayo en el tratamiento correspondiente a alimentación cíclica (4 días de alimentación / 4 días de ayuno) con una duración de 45 días, seguido de 75 días de alimentación continua con un ahorro de hasta el 35% de alimento.

Por otro lado, Wu y Dong (2001) en un estudio donde evaluaron los efectos de los ciclos repetitivos de ayuno y realimentación en la respuesta de crecimiento compensatorio de *F. chinensis*, reportaron que no existieron diferencias significativas en el consumo de alimento de los tratamientos de alimentación cíclica con respecto al control.

En el presente trabajo, al igual que el alimento consumido, el FCA de los tratamientos R7 y R14 presentaron una disminución significativa con respecto al control, lo que significa que los organismos sometidos a restricción alimenticia parcial, mejoraron la eficiencia de utilización del alimento. Esto concuerda con lo reportado en diversos estudios con la especie *P. vannamei*, donde el FCA es significativamente menor en los tratamientos sometidos a un periodo de ayuno con respecto a un control sin restricción alimenticia (Rocha *et al.*, 2019; Yildirim y Aktas, 2019).

8.2 Composición bioquímica

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis bioquímico en el hepatopáncreas, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos control (R0) y durante el crecimiento compensatorio (R7, 7 días después de realimentar) para lípidos totales, y una tendencia a la disminución de triglicéridos y colesterol respecto al tratamiento control. Lo anterior se puede atribuir a que los lípidos son la principal reserva de energía de los crustáceos, por lo que los camarones realimentados con un crecimiento acelerado pueden utilizar estos lípidos como fuente de energía, disminuyendo su proporción en su composición corporal. Esto se ha observado en *C. quadricarinatus* al encontrarse una menor concentración de lípidos en hepatopáncreas al final del período de restricción y durante los primeros treinta días del período de recuperación (Stumpf y López, 2015).

Sin embargo, en el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control y restricción (R7 al término de la restricción) debido a que estos últimos, aun con un menor acceso a lípidos, no requieren de la movilización de sus reservas energéticas al tener una tasa de crecimiento menor.

Para el caso de los lípidos y triglicéridos en plasma, se encontró que estos fueron más abundantes durante la realimentación, seguido del tratamiento control y por último restricción. Esto puede ser consecuencia de la mayor movilización de estos durante la realimentación como se mencionó anteriormente, ya que en artrópodos estas macromoléculas son transportadas a otros tejidos a través del plasma por medio de lipoproteínas (Ruiz *et al.*, 1997).

En resumen, en cuanto a composición bioquímica, la baja concentración de lípidos totales en hepatopáncreas, pero alta en plasma se puede atribuir a que si bien las reservas lipídicas deben ser restablecidas rápidamente, como un mecanismo para la captación inmediata de la energía contenida en el alimento (Soengas *et al.*, 1996), estas también se están utilizando rápidamente debido al crecimiento acelerado.

Tomando en cuenta que en el presente trabajo las muestras de los organismos realimentados se tomaron 7 días después de iniciado el periodo de recuperación, podemos decir, que los organismos en este tiempo aún no vuelven a las condiciones de

crecimiento normales como el grupo control, ya que diversos estudios indican que los organismos expuestos a una restricción seguida de un periodo de realimentación muestran un retorno de los parámetros bioquímicos a valores similares a los del grupo control hasta 14 días o más después de iniciada la realimentación en peces y crustáceos (Soengas *et al.*, 1996; Stumpf y López, 2015). Es decir, los lípidos provenientes de la ingesta de alimentos en los camarones realimentados, se utilizó para compensar el crecimiento reprimido durante la restricción alimenticia, esto a través de su distribución hacia otros tejidos por medio del plasma, y una vez que las condiciones se restablecen, los lípidos se almacenan en el hepatopáncreas.

8.3 Análisis de expresión diferencial

8.3.1 Genes sobre expresados durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei*

De acuerdo al análisis de expresión diferencial, se observó una sobre expresión de genes relacionados al metabolismo energético. En el caso de la utilización de lípidos como fuente de energía, se encontró una sobreexpresión del gen pirofosfatasa / fosfodiesterasa 6, el cual codifica para una proteína transmembranal cuya función es hidrolizar compuestos que contienen colina, como lisofosfatidilcolina y glicerofosforilcolina (Greiner-Tollesrud *et al.*, 2012; Sakagami *et al.*, 2005). De acuerdo a diversos autores, la fosfatidilcolina (FC), un lípido polar constituyente de la membrana, y sus metabolitos diacilglicerol, lisofosfatidilcolina, pueden estimular la actividad de la proteína cinasa C (Besterman *et al.*, 1986; Exton, 1990; Nishizuka, 1992), la cual se encarga de transducir las señales celulares que promueven la hidrólisis de lípidos (Newton, 2010).

Por otra parte, se encontraron genes relacionados al metabolismo de aminoácidos de tipo glucogénico como los que codifican para las proteínas serina deshidratasa y serina racemasa. Ambos involucrados en el catabolismo de la serina, a través del cual se obtiene piruvato (Rosas *et al.*, 2000) que participa en el proceso de producción de energía al entrar al ciclo de Krebs (Brody, 1998; Mendz., 1997). Lo anterior se atribuye a que, durante el proceso de crecimiento compensatorio, el requerimiento de energía es mayor debido al rápido crecimiento del organismo. Como lo indican Souza *et al.* (2003),

en peces, cuando la alimentación se normaliza, se restablecen los procesos fisiológicos y utilizan el alimento principalmente para satisfacer las necesidades de energía para el mantenimiento de los procesos vitales mediante el restablecimiento del catabolismo de los tejidos, y sólo después de eso, el resto se utiliza para el crecimiento.

Durante el catabolismo de la serina para la formación de ácido pirúvico en su incorporación en el metabolismo glucídico y en la gluconeogénesis, se libera amonio, producto de la desaminación de la serina, el cual es transportado por una proteína encargada del transporte transmembrana de amonio (Huang y Peng, 2005), codificada por el gen Transportador de amonio Rh tipo A, sobre expresado durante este proceso, y cuya función ha sido reportada en otros crustáceos como *Portunus trituberculatus* (Si *et al.*, 2018).

El gen actina T2 también resultó con una sobre expresión durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei*, el cual codifica para una proteína muscular involucrada en la organización de miofibrillas (Fu, 2014). Las miofibrillas son elementos contráctiles de las células del músculo esquelético, por lo cual están relacionadas al desarrollo del músculo y contracción muscular (Zhang *et al.*, 2017). Este gen ha sido reportado por He *et al.* (2015) en la carpa *Ctenopharyngodon idella* después del crecimiento compensatorio, en el cual se encontró la sobre expresión de dicho gen al comparar la fase de ayuno *versus* realimentación, atribuido como en el presente estudio, al incremento de la masa muscular producto del crecimiento compensatorio.

Además, se identificaron genes involucrados en el proceso de muda de los camarones como proteína de la cutícula pupal 36, proteína de cutícula AMP1A y quitinasa 2. Este último, codifica para una proteína encargada de la hidrólisis de quitina, el cual es un componente principal de los materiales orgánicos en la cutícula, que forma parte de los cambios morfológicos y fisiológicos durante la etapa de pre-muda para separar la cutícula vieja de la nueva cutícula, etapa en la cual sucede la muda (Nagasawa, 2012; Rocha-Estrada, 2008). La sobre expresión de estos genes se atribuye al crecimiento acelerado durante la fase de realimentación como producto del crecimiento compensatorio.

El estrés oxidativo puede definirse como el desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986). El estrés oxidativo puede presentarse en todos los organismos ante cualquier alteración de las condiciones óptimas (Halliwell, 1987), derivada de la propia acción del metabolismo, y que como consecuencia ejerce daño a diferentes objetivos celulares como el ADN, los lípidos y las proteínas que modifican las funciones celulares normales (Sacristán *et al.*, 2016). Respecto al crecimiento acelerado mostrado en camarones realimentados, Fernández *et al.* (2009) establecen que el aumento de la actividad celular necesaria para un mayor crecimiento conduce a una mayor producción de EROs como un subproducto del metabolismo, además, afecta negativamente el nivel de protección antioxidante. Esto concuerda con la sobre expresión en el presente trabajo de los genes UDP-glucuronosiltransferasa 2B10 y citocromo P450 2L1, que se encargan de la biotransformación de compuestos endógenos como productos del estrés oxidativo según lo indican Guo *et al.* (2016) al exponer a *P. vannamei* a estrés nítrico.

Los genes sobre expresados mencionados anteriormente se relacionan con los resultados obtenidos por el análisis de ontología de genes, al determinar que el mayor porcentaje de genes está asociado al proceso metabólico de macromoléculas celulares como proceso biológico, a actividad catalítica como función molecular y componente integral de la membrana como componente celular. De igual forma, los resultados del análisis KEGG arrojaron un mayor porcentaje de genes asociados a rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo de lípidos y aminoácidos como fuente de energía para compensar la demanda de energía necesaria para el crecimiento acelerado.

8.3.2 Genes sub expresados durante el crecimiento compensatorio de *P. vannamei*

Como forma de compensar energéticamente el crecimiento acelerado, algunas rutas se vieron afectadas, como el metabolismo de carbohidratos. Por ejemplo, el gen triosafosfato isomerasa, asociado a la biosíntesis de carbohidratos en la gluconeogénesis y en la glucólisis en *P. vannamei* (López-Zavala *et al.*, 2016), está involucrado en el paso 1 de la subvía que sintetiza D-gliceraldehído 3-fosfato a partir de gliceronona fosfato. Además del gen sub expresado Glicoproteína -N acetilgalactosamina 3-betagalactosiltransferasa 1, que forma parte de la biosíntesis de O-glicosilación del

tipo de mucina que juega un papel potencial en la clasificación y secreción de glicoproteínas, adhesión celular y procesos inmunológicos (Hanisch, 2001).

Otros genes reprimidos durante el crecimiento compensatorio, forman parte del sistema inmune del camarón, como la proteína de choque térmico 21, la cual es esencial en la respuesta al estrés microbiano al modular la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico en otros invertebrados como *Procambarus clarkii* (Dai *et al.*, 2020). Además, de carbohidrato sulfotransferasa 11 que codifica para una de las enzimas que sintetizan el condroitín sulfato (CS), el cual tiene amplias funciones inmunitarias y desempeña un papel fundamental en la mediación de la infección del huésped por microorganismos patógenos. Este gen ha sido reportado como participó en la respuesta inmune de la especie *P. clarkii* expuesto al virus del síndrome de la mancha blanca y *Aeromonas hydrophila* (Zhang *et al.*, 2020).

Por último, el gen sub expresado E3 ubiquitina-proteína ligasa, forma parte del sistema de ubiquitina donde se encarga de la regulación de entre otras cosas la respuesta inmune, la cual ha sido reportada por Sun *et al.* (2019) en *P. vannamei* al responder a la infección por virus de la mancha blanca.

La disminución de la expresión de genes asociados a la respuesta inmune del camarón durante el proceso de crecimiento compensatorio, indica una potencial susceptibilidad ante la presencia de patógenos en el cultivo, por lo que debe considerarse este factor para su aplicación en las granjas de camarón.

9. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que los tratamientos R7 y R14 (7 y 14 días del 50% de restricción alimenticia) propician un crecimiento compensatorio, logrando obtener hasta un 14.67% de ahorro de alimento en 7 semanas de cultivo.

Durante el proceso de crecimiento compensatorio, para cubrir la necesidad energética por el crecimiento acelerado, *P. vannamei* incrementa la movilización de lípidos como reservas energéticas producto de la realimentación, disminuyendo las concentraciones de estos metabolitos en hepatopáncreas e incrementándolas en plasma.

De acuerdo a los resultados de expresión génica, *P. vannamei* utiliza preferencialmente el metabolismo de lípidos y aminoácidos glucogénicos como fuente de energía. Sin embargo, este proceso reprime la expresión de genes asociados a la respuesta inmune, lo cual pudiera representar una desventaja durante el cultivo de camarón, al estar potencialmente más expuestos a enfermedades.

10. LITERATURA CITADA

Ali, M., A. Nicieza, R. J. Wootton. 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries*. 4(2):147–190.

Álvarez, J. S., J. Galindo, B. Jaime, E. Pelegrín. 2003. Evaluación de diferentes alimentos artificiales en el engorde de juveniles de Camarón Blanco *Penaeus schmitti*. Congreso Intberoamericano Virtual de Acuicultura pp. 998–1005.

Alves, D. D. 2003. Crescimento compensatório em bovinos de corte. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 98(546):61-67.

Andrews, S., P. Lindenbaum, B. Howard, P. Ewels. 2011. FastQc hig throughput sequence Qc Report. V 0.11.7. Cambridge, UK: Babraham bioinformatics

APROMAR. 2008. (08 de septiembre de 2020). Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. Obtenido de: <http://www.apromar.es/Informes/Informe%20APROMAR%202008.pdf>

Arauco, L. R. R., V. B. Costa. 2012. Alimentary restriction in the productive revenue of *Oreochromis niloticus*. *Comun. Sci*. 3(2):134-138.

Artiles, M. A., B. Jaime, J. Galindo. 1996. Manejo del alimento en el engorde semi-intensivo del camarón blanco (*Penaeus schmitti*) utilizando comederos. *Rev. Cub. Inv. Pesq*. 20(1):10-14.

Assis, Y. P. A. S., L. de Assis-Porto, N. F. A. C. de Melo, G. D. A. Palheta, R. K. Luz, G. C. Favero. 2020. Feed restriction as a feeding management strategy in *Colossoma macropomum* juveniles under recirculating aquaculture system (RAS). *Aquaculture*. 529

Bador, R. F. 2000. Uso de Charolas de Alimentación para el Cultivo de Camarón en Sudamérica. (4°, 1998, La Paz, Baja California Sur). La Paz, Baja California Sur. *Avances en Nutrición Acuícola*. pp. 540-549

Barham, D., P. Trinder. 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, 97(1151), 142-145.

Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method to total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12:103-118.

Besterman, J., V. Duronio, P. Cuatrecasas. 1986. Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: A pathway for generation of a second Messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6785-6789.

Blanquet I., A. Oliva-Teles. 2010. Effect of feed restriction on the growth performance of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) juveniles under commercial rearing conditions. *Aquac.* 41:1255-1260.

Brody, T. 1999. Protein. (ed.). *Nutritional Biochemistry*. Academic Press. Segunda edición. Londres, Inglaterra. pp 421-489.

Carrasco-Escalante, J. C., J. I. León-Balderrama. 2017. Capacidad de absorción y competitividad en el cultivo de camarón del municipio de Ahome, Sinaloa. *Estud. Soc.* 27(50):0-0

Cartens, G. E., D. E. Johnson, M. A. Ellenberger, J. D. Tatum. 1991. Physical and chemical components of the empty body during compensatory growth in beef steers. *J. Anim. Sci.* 69(3):251-3264.

Chandhini, S., V. J. Rejish-Kumar. 2019. Transcriptomics in aquaculture: current status and applications. *Rev Aquac.* 11(4):1379-1397.

Chen, S., Y. Zhou, Y. Chen, J. Gu. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 34(17):884-890.

Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-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.

CONAPESCA. 2018. (08 de septiembre de 2020). Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. Obtenido de https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2018/ANUARIO_2018.pdf

Cuéllar-Lugo, M. B., A. Asian-Hoyos, J. P. Juárez-Sánchez, J. L. Reta-Mendiola, F. Gallardo-López. 2018. Evolución normativa e institucional de la acuacultura en México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. 15(4):541-564.

Dai, L. S., S. Kausar, I. Gul, H. L. Zhou, M. N. Abbas, M. J. Deng. 2020. Molecular characterization of a heat shock protein 21 (Hsp21) from red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* in response to immune stimulation. *Dev. Comp. Immunol.* 111:1-7.

Dall, W., P. C. Rothlisberg, D. J. Staples. 1990. *The biology of Penaeidae*. Academic Press. Nueva York, USA. 489p.

Exton, J.H., 1990. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 265:1-4.

FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>

Farbridge K. J., P. A. Flett, J. F. Leatherland. 1992. Temporal effect of restricted diet and compensatory increase dietary intake on thyroid function, plasma growth hormone levels and tissue lipid reserves of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 104:157–174

Fernández, J. M., M. E. Da Silva-Grigoletto, I. Túnez-Fiñana. 2009. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deporte*. 2(1):19-34.

Flores-Leyva, L. 2006. Evaluación de pigmentos carotenoides como aditivos alimentarios para la prevención de infecciones producidas por el virus de la mancha blanca (WSSV) y la bacteria *Vibrio harveyi* en el camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis (Maestría en Ciencias en el uso, manejo y preservación de los recursos naturales). La Paz, B.C.S. CIBNOR. 112 p.

Foes, G., D. Krummenaeur, G. Lara, L. Poersh, W. Wasielesky. 2016. Long term storage and the compensatory growth of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in aquaculture ponds. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44(3):588-594.

Fu, L., S. Zhang, J. Zhou, C. Liu, J. Lin, Y. Wang. 2014. Alterations of protein expression in the muscle of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) contribute to postmortem changes. *J. Shellfish Res.* 33(3):815-823.

Fujimoto, E. K., N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

Gabriel, N. N., E. Omoregie, M. Tjipute, L. Kukuri, L. Shilombwelwa. 2017. Short-term Cycles of Feed Deprivation and Refeeding on Growth Performance, Feed Utilization, and Fillet Composition of Hybrid Tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). *Isr J Aquac.* 69:1-7.

Götz, S., J. M. García-Gómez, J. Terol, T. D. Williams, S. H. Nagaraj, M. J. Nueda, A. Conesa. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*, 36(10):3420-3435.

Greiner-Tollersrud, L., T. Berg, H. M. Stensland, G. Evjen, O. K. Greiner-Tollersrud. (2013). Bovine brain myelin glycerophosphocholine choline phosphodiesterase is an alkaline lysosphingomyelinase of the eNPP-family, regulated by lysosomal sorting. *Neurochem. Res.* 38(2):300-310.

Gucic, M. 2008. Digestibilidad in vivo de alimentos comerciales y experimentales para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado a diferentes salinidades. Tesis (Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales). La Paz, Baja California, Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 98p.

Guo, H., J.A. Xian, A-L. Wang. 2016. Analysis of digital gene expression profiling in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress. *Fish Shellfish Immunol.* 56:1-11.

Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of Lipids.* 44(2-4):327-340.

Hanish, F. 2001. O-glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem.* 382(2):143-149.

Haroun, R., A. Makol, J. Ojeda, F. Simard. 2007. Guía para el desarrollo sostenible de acuicultura mediterránea 1: interacciones entre la acuicultura y el medio ambiente. Solprint Mijas. Primera edición. Málaga, España. 114p.

He, L., Y. Pei, Y. Jiang, Y. Li, L. Liao, Z. Zhu, Y. Wang. 2015. Global gene expression patterns of grass carp following compensatory growth. *BMC Genom.* 16(1):184-202.

Hendrickx, M. E., F. D., Estrada Navarrete. 1996. Los camarones penaeoidea bentónicos [crustacea: decápoda: dendrobranchiata] del Pacífico Mexicano. Editorial Conabio, Icml-unam. Primera edición. México, D.F. 147p

Hornick, J. L., C. Van Eenaeme, O. Gérard, I. Dufrasne, L. Istasse. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domestic animal endocrinology.* 19:121-132.

Huang, C., J. Peng. 2005. Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(43):15512-15517.

INAPESCA. 2013. (08 de septiembre de 2020). Instituto Nacional de Pesca. Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308082/02camaron_blanco_pacifico.pdf

INAPESCA. 2018. (04 de Octubre de 2020). Instituto Nacional de Pesca. Obtenido de <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuacultura-camaron-blanco-del-pacifico>

Johansen, K. A., K. Overturf. 2006. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 144(1):119-127.

Kanehisa, M., Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, M, Tanabe. 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research*, 44(1):457-462.

Kim, D., B. Langmead, S. L. Salzberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods.* 12(4):357-360.

Koditschek, L. K., W. W. Umbreit. 1969. α -Glycerophosphate oxidase in *Streptococcus faecium* F 24. *Journal of bacteriology.* 98(3):1063-1068.

Kumar, P., A. Sudhagar, V. Harikrishna, M. Jayant. 2017. Practical significance of restricted feeding regime in aquaculture. *Aquaculture Asia Magazine.* 21(1):18.

Lin, X-T., J-X. Pan, Z-N. Xu, Z-J. Li, H. Li. 2008. Effect of periodic starvation on feeding, growth and defecation of *Litopenaeus vannamei*. *Acta Hydrobiol. Sin.* 32(3):403-407.

Liu, X., S. Zeng, S. Liu, G. Wang, H. Lai, X. Zhao, S. Bi, D. Guo, X. Chen, H. Yi, Y. Su, Y. Zhang, G. Li. 2020. Identifying the Related Genes of Muscle Growth and Exploring the Functions by Compensatory Growth in Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*). *Front. Physiol.* 11:1215.

López-Zavala, A., J. S. Carrasco-Miranda, C. D. Ramírez-Aguirre, M. López-Hidalgo, C. G. Benitez-Cardoza, A. Ochoa-Leyva, C. S. Cardona-Félix, C. Díaz-Quezada, E. Rudiño- Piñera, R. R. Sotelo-Mundo, L. G. Brieba. 2016. Structural insights from a novel invertebrate triosephosphate isomerase from *Litopenaeus vannamei*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 1864(12):1696-1706.

Love, M. I., W. Huber, S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12):550.

Luchini, L. S Panné-Huidobro. 2008. (05 de octubre de 2020). Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. Obtenido de: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/113-perspectivas.pdf

Luna-González, A., J. T. Moreno-Herrera, Á. I. Campa-Córdova, H. A. González-Ocampo, J. A. Fierro-Coronado, P. Álvarez-Ruiz, M. A. Bueno-Ibarra. 2013. Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal of Aquatic Research.* 41(5):898–907.

Maciel, J. C., C. J. Francisco, K. C. Miranda-Filho. 2018. Compensatory growth and feed restriction in marine shrimp production, with emphasis on biofloc technology. *Aquacult Int.* 26:203-212.

Madeira, F., Y. Mi Park, J. Lee, N. Buso, T. Gur, N. Madhusoodanan. 2019. EMBOSS Backtranseq. *Nucleic Acids Res.* 47:636-641.

Mangel, M., S. B. Munch. 2005. A life-history perspective on short-and long-term consequences of compensatory growth. *Am. Nat.* 166(6):155-176.

Martínez-Córdova, L. R. 1993. Camaronicultura: Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. AGT Editor, S. A. Primera Edición. México, D. F. 1-20, 27p.

Martínez-Córdova, L. R. 2000. Formas y recomendaciones de manejo del alimento y la alimentación para una camaronicultura sustentable. (3°, 2000, Culiacán, Sinaloa). Culiacán, Sinaloa. Aqua México. pp. 271-283.

Martínez-Cordova, L. R. 2008. Introducción. En: Molina-Poveda, C., H. Villarreal-Colmenares. (ed.). Estrategias de alimentación en la etapa de engorda del camarón. Primera edición. La Paz, B.C.S, México. 110p.

Martínez-Córdova, L. R., M. A. Porchas-Cornejo, H. Villarreal-Colmenares, J. A. Calderón-Pérez, J. Naranjo-Paramo. 1998. Evaluation of three feeding strategies on the culture of white shrimp *penaeus vannamei* boone 1931 in low water exchange ponds. *Aquacultural Engineering*. 17(1):21-28.

Martínez-Córdova, L. R., M. Ezquerro-Brauer, L. Bringas, E. Aguirre-Hinojosa, M. C. Garza-Aguirre. 2002. Optimización de Alimentos y Prácticas de Alimentación en el Cultivo de Camarón en el Noroeste de México. En: (6°, 2002, Cancún, Quintana Roo). Cancún, Quintana Roo. Avances en Nutrición Acuícola. pp. 560-581.

Mendz, G. L., G. E. Ball, D. J. Meek. 1997. Pyruvate metabolism in *Campylobacter* spp. *Biochim Biophys Acta*. 1334(2-3): 291-302.

Molina-Poveda, C. W. Quadros, L. Martínez-Córdova, I. Fraga. 2008. Dosificación y distribución del balanceado en granja. En: Molina-Poveda, C., H. Villarreal-Colmenares. (ed.). Estrategias de alimentación en la etapa de engorda del camarón. Primera edición. La Paz, B.C.S, México. 110p.

Nagasawa, H. 2012. The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. *Front Biosci*. 4:711-20.

Newton, A. C. 2010. Protein Kinase C: Relaying Signals from Lipid Hydrolysis to Protein Phosphorylation. En: Bradshaw, R.A., E.A. Dennis. (ed.): *Handbook of Cell Signaling*. Segunda edición. California. pp. 1123-1129.

Nishizuka, Y., 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614

Ojeda, A., F. Molina, D. Carmona. 2007. Crecimiento compensatorio: una estrategia de manejo de la disponibilidad de pasturas. (24 de septiembre de 2020). Obtenido de https://produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/externo/30-Articulo-4.pdf

Oksbjerg, N., M. Therkildsen. 2017. Myogenesis and Muscle Growth and Meat Quality. *New Aspects of Meat Quality*. En: Farrell, A. (ed.). *Encyclopedia of Fish Physiology*. Editorial Academic Press. Primera edición. San Diego, California. pp. 33-62.

Olazabal, J., F. San Martín. 2008. (24 de septiembre 2020). Obtenido de: <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/NUTRICION/MATERIAL%202012/Crecimiento%20Compensatorio.pdf>

Onischuk, L. A., A. D. Kennedy. 1990. Growth hormone, insulin, prolactin and glucose levels in ewe and ram lambs 11 Pro d u c c i ó n during normal and compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.* 7:365--381.

Pertea, G., M. Pertea. 2020. GFF Utilities: GffRead and GffCompare. *F1000Research*. 9(304):1-17.

Pertea, M., D. Kim, G. M. Pertea, J. T. Leek, S. L. Salzberg. (2016). Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nature protocols*, 11(9):1650.

Platas-Rosado, D. E., J. Vilaboa-Arroniz. 2014. La acuicultura mexicana: potencialidad, retos y áreas de oportunidad. *Revista mexicana de agronegocios*. 35:1065-1071.

Rahman, F., A. K. Ghosh, S. S. Islam. 2019. Effect of time-restricted feeding and refeeding regimes on compensatory growth, body composition, and feed utilization in prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) culture system. *Aquaculture*. 32(3):236-249.

Richmond, W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clinical chemistry*. 19(12):1350-1356.

Rocha, J. V., J. F. Silva, C. Barros, S. Peixoto, R. Soares. (2019). Compensatory growth and digestive enzyme activity of *Litopenaeus vannamei* submitted to feeding restriction in a biofloc system. *Aquac. Res.* 1-10.

Rocha-Estrada, J. 2008. Metabolismo de la quitina del camarón blanco *Penaeus vannamei*: ARNm de Quín sintasa y quitinasa cuticulares, durante el ciclo de muda. Tesis (Maestría en Ciencias en el uso, manejo y preservación de los recursos naturales). La Paz, B.C.S. CIBNOR. 94 p.

Roe, J. H., J. M. Bailey, R. R. Gray, J. N. Robinson. Complete Removal of Glycogen from Tissues by Extraction with Cold trichloroacetic Acid Solution. *The Journal of Biological Chemistry.* 236(5):1244-1246 (1961).

Román-Trufero, A., V. García-Prieto, A. Martínez, K. Osoro, Celaya, R. 2019. Beef steer production from two local breeds under two management systems differing in the utilisation of mountain pastures. *Italian Journal of Animal Science.* 18(1):1174-1185.

Rosas, C., G. Gaxiola, A. Sánchez. 2000. El Metabolismo del Nitrógeno y su Relación con los Requerimientos Nutricionales de los Camarones Peneidos. En: IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. (4°, 2000, La Paz, Baja California Sur). La Paz, Baja California, Sur. *Avances en Nutrición Acuícola.* pp. 166-186.

Ruíz-Verdugo, L. M., M. L. García-Bañuelos, F. Vargas-Albores, I. Higuera-Ciapara, G. M. Yepiz-Plascencia. 1997. Amino Acids and Lipids of the Plasma HDL from the White Shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comp. Biochem. Physiol.* 118(1):91-96.

Ryan, W. J., I. H. Williams, R. J. Moir. 1993. Compensatory growth in sheep and cattle. II. Changes in body composition and tissue weights. *Aust. J. Agric. Res.* 44(7):1623-1633

Sacristán, H. J., M. Ansaldo, L. M. Franco-Tadic, A. V. Fernandez Gimenez, L. S. Lopez Greco. 2016. Long-term starvation and posterior feeding effects on biochemical and physiological responses of midgut gland of *Cherax quadricarinatus* juveniles (Parastacidae). *PloS one*, 11(3):1-19.

Sakagami, H., J. Aoki, Y. Natori, K. Nishikawa, Y. Kakehi, Y. Natori, H. Arai. 2005. Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific

glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *J. Biol. Chem.* 280(24):23084-23093.

Salame, M. 1993. Feeding Trays in Penaeid Shrimp Ponds. *Aquaculture Magazine* 19(4):59-63.

Santiago, M. L., A. Espinosa, M.C. Bermúdez. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas.* 40(3):22-32.

Shimojo, N., K. Naka, C. Nakajima, C. Yoshikawa, K. Okuda, K. Okada. 1989. Test-strip method for measuring lactate in whole blood. *Clinical Chemistry*, 35(9):1992-1994.

Si, L., H. Pan, H. Wang, Z. Zhang. 2018. Identification of the role of Rh protein in ammonia excretion of the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *J. Exp. Biol.* 221(20):1-38.

Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemi.* 25(12): 1058-1071

Soengas, J.L., E. F. Strong, J. Fuentes, J. A. R. Veira, M. D. Andrés. 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol Biochem* 15(6):491-511.

Souza, V. L., E. C. Urbinati, M. E. I. G. Martins, P. C. Silva. (2003). Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetidos a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. *Rev Bras Zootec* 32:19–28.

Stumpf, L. C. Tropea, L. López-Greco. 2014. Recovery growth of *Cherax quadricarinatus* juveniles fed on two high-protein diets: Effect of daily feeding following a cyclic feeding period on growth, biochemical composition and activity of digestive enzymes. *Aquaculture.* 433:404-410.

Stumpf, L., L. S. López-Greco. 2015. Compensatory Growth in Juveniles of Freshwater Redclaw Crayfish *Cherax quadricarinatus* Reared at Three Different Temperatures: Hyperphagia and Food Efficiency as Primary Mechanisms. *PLoS One.* 10(9):1-19.

Stumpf, L., P. N. Sarmiento-Cárdenas, S. Timpanaro, L. López-Greco. 2019. Feasibility of compensatory growth in early juveniles of “red claw” crayfish *Cherax quadricarinatus* under high density conditions. *Aquaculture*. 510(2019):302-310.

Sun, M., S. Li, K. Yu, J. Xiang, F. Li. 2019. An E3 ubiquitin ligase TRIM9 is involved in WSSV infection via interaction with β -TrCP. *Dev. Comp. Immunol.* 97:57-63.

Tacon, A. G., D. Jory, A. Nuñez. 2013. Shrimp feed management: issues and perspectives. *On-farm feeding and feed management in aquaculture*. (08 de septiembre de 2020). Obtenido de: <http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/T583/root/18.pdf>.

Tuan, V. V. 2016. Antibacterial and antiviral activity of different haemocyte subpopulations of *Litopenaeus vannamei*. Tesis (Doctor in Veterinary Sciences). Belgium. Ghent University. 164p.

Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11:256-265.

Vega-Villasante, F., H. Nolasco-Soria, R. Civera-Cerecedo, R. González-Valdés, M. Oliva-Suárez. 2000. Alternativa para la alimentación del Camarón en Cultivo: El Manejo de la Muda. En: (5°, 2000, Mérida, Yucatán). Mérida, Yucatán. *Avances en Nutrición Acuícola*. pp. 19- 22

Wang, Z., M. Gerstein, M. Snyder. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10(1):57–63.

Wu, L., S. Dong, F. Wang, X. Tian, S. Ma. 2001. The Effect of Previous Feeding Regimes on the Compensatory Growth Response in Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *J. Crust. Biol.* 21(3):559-565.

Wu, L., S. Dong. 2001. The effects of repetitive ‘starvation-and-refeeding’ cycles on the compensatory growth response in chinese shrimp, *fenneropenaeus chinensis* (osbeck, 1765) (decapoda, penaeidae). *Crustaceana*. 74(11):1225-1239.

Wu, L., S. Dong. 2002. Compensatory growth responses in juvenile chinese shrimp, *fenneropenaeus chinensis*, at different temperaturas. *J. Crust. Biol.* 22(3):511-520.

Yildirim, M., M. Aktas. 2019. Could the growth of *Litopenaeus vannamei* be compensated by long-term cyclic feed deprivation and following refeeding?. *J. Appl. Aquac.* 31(3):224-235.

Zhang, L., R. Shi, H. Ouyang, Y. Li. 2020. Cloning and characterization of *chst11* from *Procambarus clarkii* involved in the host immune response of white spot syndrome virus and *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 102:82-91.

Zhang, X., X. Zhang, J. Yuan, J. Du, F. Li, J. Xiang. 2017. Actin genes and their expression in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Mol. Genet. Genom.* 293(2):479-493.

Zhu, Z-M., X-T. Lin, J-X. Pan, X-N. Zhu. 2016. Effect of cyclical feeding on compensatory growth, nitrogen and phosphorus budgets in juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res* 47:283–289.

11. ANEXOS

ANEXO A. Comandos empleados para el análisis bioinformático.

a) Limpieza de lecturas

```
fastp -i /librería_fwd.fq.gz -l /librería_reverse.fq.gz -o /librería_fwd_paired.fq.gz -O
/librería_reverse_paired.fq.gz -g -f 15 -F 15 -h /archivo_de_salida
```

b) Eliminación de sitios de splicing

```
/programas/hisat2-2.1.0/extract_splice_sites.py genoma_de_referencia.gtf
>archivo_de_salida.ss
```

c) Eliminación de exones

```
/programas/hisat2-2.1.0/extract_exons.py genoma_de_referencia.gtf
>archivo_de_salida.exon
```

d) Indexado del genoma de referencia

```
/programas/hisat2-2.1.0/hisat2-build --ss PvMa.ss --exon PvMa.exon
genoma_de_referencia.fna genoma_indexado
```

e) Alineamiento de las librerías al genoma

```
/programas/hisat2-2.1.0/hisat2 -p 8 --dta -x /genoma_indexado -1
librería_fwd_paired.fq.gz -2 librería_reverse_paired.fq.gz -S muestra.sam
```

f) Conversión de archivo .sam a .bam

```
/programas/samtools-1.9/samtools sort -@ 8 -o muestra.bam muestra.sam
```

g) Ensamblaje y cuantificación de transcritos

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

h) Fusión de transcritos de todas las muestras


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

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 : 52825 in 34570 loci (44310 multi-exon transcripts)

(6649 multi-transcript loci, ~1.5 transcripts per locus)

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

Super-loci w/ reference transcripts: 29626

	Sensitivity	Precision
Base level:	100.0	90.0
Exon level:	99.5	90.7
Intron level:	99.9	94.2
Intron chain level:	100.0	79.4
Transcript level:	99.9	75.0
Locus level:	100.0	85.7

Matching intron chains: 35166

Matching transcripts: 39622

Matching loci: 30233

Missed exons: 0/186177 (0.0%)

Novel exons: 10518/205125 (5.1%)

Missed introns: 65/154647 (0.0%)

Novel introns: 4014/164144 (2.4%)

Missed loci: 0/30248 (0.0%)

Novel loci: 4944/34570 (14.3%)

Total union super-loci across all input datasets: 34570

52825 out of 52825 consensus transcripts written in
NUEVOmergedcomp.annotated.gtf (0 discarded as redundant)

j) Estimación de la abundancia creación de recuentos de tabla

```
/programas/stringtie-2.1.1.Linux_x86_64/stringtie -e -B -p 8 -G
stringtie_merged.gtf -o ballgown/muestra.gtf /muestra.bam
```

k) 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
#Cargar librerías
library("DESeq2")
library("ggplot2")
library("dplyr")
library("pheatmap")
#Preparar directorio
setwd("C:/Users/mariadejesus/Desktop/análisismariabien/Deseq2/bien/Control-
Real/")
#Ingresar metadata
sampleTable <- read.csv('C_Real_Metadata_maria.csv')
#Ingresar matriz de recuentos de genes
counts <- read.csv("C_Real_gene_count_matrix.csv", row.names = 1)
head(sampleTable)
dds <- DESeqDataSetFromMatrix(round(counts), colData = sampleTable, design
= ~ Condition)
dds <- DESeq(dds)
```

```
#Normalizar
rld <- rlog(dds)
cnorm <- counts(dds, normalized = T)
res <- results(dds)
#Eliminación de genes de baja expresión
res <- res[sort.list(res$padj),]
res <- res[sort.list(res$pvalue),]
write.csv(res, file='CCR_res_gene_count_norm.csv')
#Asociar nombres de columnas con las muestras
colnames(cnorm) <- sampleTable$ids
#asociar nombres de muestras a genes
rownames(sampleTable) <- sampleTable$ids
```

I) Genes sobre expresados

	Locus	Gen	baseMean	log2FoldCI	lfcSE	stat	pvalue
MSTRG.9922	LOC113819254	actin-like	600.0847	2.59	0.53062	4.875232	1.09E-06
MSTRG.9005	LOC113817430	carboxy-terminal kinesin 2-like	703.9168	3.59	0.798248	4.500476	6.78E-06
MSTRG.9925	LOC113819264	actin-like	4469.364	2.19	0.54288	4.024983	5.70E-05
MSTRG.5943	LOC113811001	cuticle protein AMP1A-like	14.51841	7.83	2.128301	3.678683	0.000234
gene18829	LOC113820418	extensin-like	9.355408	5.22	1.555999	3.35226	0.000802
MSTRG.9924	LOC113819263	actin-like	664.1016	1.66	0.515314	3.218638	0.001288
MSTRG.1432	LOC113826015	ammonium transporter Rh type A-like	46.39485	2.88	0.908915	3.169172	0.001529
MSTRG.10852	LOC113821158	epsin-like	15.68205	5.09	1.655368	3.077692	0.002086
MSTRG.13782	LOC113827175	serine dehydratase-like	110.0847	1.59	0.559069	2.851502	0.004
MSTRG.8863	LOC113817182	pro-resilin-like	7.169729	6.81	2.39401	2.846527	0.00442
MSTRG.298	LOC113804339	cuticle protein CP1499-like	7.391975	6.85	2.54179	2.695861	0.007021
MSTRG.3569	LOC113806325	UDP-glucuronosyltransferase 2B14-like	22.99117	2.91	1.161533	2.508205	0.012135
MSTRG.5712	LOC113810455	uncharacterized PE-PGRS family protein PE_PGRS46-like	8.673307	5.67	2.267298	2.500812	0.012391
gene16124	LOC113817413	ESX-1 secretion-associated protein EspB-like	6.797172	1.93	0.778438	2.483286	0.013018
MSTRG.6683	LOC113812522	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 6-like	48.7223	1.79	0.723582	2.478604	0.01319
MSTRG.12783	LOC113824913	probable chitinase 2	54.811	1.75	0.715196	2.446867	0.01441
gene5161	LOC113805241	exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2-like	16.74183	1.84	0.770726	2.384681	0.017094
MSTRG.7240	LOC113813620	NADPH azoreductase-like	18.64437	2.71	1.173357	2.310922	0.020837
gene376	LOC113803430	proton channel OtopLc-like	29.72145	3.21	1.393169	2.304691	0.021184
MSTRG.6196	LOC113811508	zinc finger protein 12-like	13.05417	1.96	0.857767	2.280776	0.022562
gene28707	LOC113800600	basic helix-loop-helix transcription factor amos-like	2.855701	5.47	2.40892	2.272694	0.023045
MSTRG.515	LOC113808328	phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1-like	14.64046	1.99	0.886561	2.24305	0.024894
gene2686	LOC113829737	mucin-5AC-like	4.200952	4.23	1.938923	2.184051	0.028958
gene2770	LOC113830185	cuticle protein AMP1A-like	2.576119	5.33	2.460493	2.164577	0.03042
gene21045	LOC113822883	aromatic-L-amino-acid decarboxylase-like	3.867876	5.92	2.769129	2.139591	0.032388
gene667	LOC113806457	homeobox protein MSX-3-like	12.62925	2.94	1.413493	2.07878	0.037638
gene4528	LOC113804521	protein regulator of cytokinesis 1-like	5.76041	4.06	1.974003	2.056578	0.039727
gene7378	LOC113807691	cytochrome P450 2L1-like	3.816019	5.90	2.871739	2.053689	0.040006
MSTRG.9932	LOC113819332	mucin-2-like	39.69051	2.63	1.298662	2.024197	0.04295
gene12079	LOC113812910	serine racemase-like	17.78529	1.71	0.851401	2.006395	0.044814
gene13330	LOC113814294	U8 snoRNA-decapping enzyme-like	9.560365	1.76	0.887519	1.979843	0.047721
MSTRG.9371	LOC113818194	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4-like	17.76249	1.59	0.81051	1.961726	0.049794

m) Genes sub expresados

	Locus	Gen	baseMean	log2FoldCI	lfcSE	stat	pvalue
MSTRG.1028	LOC113820086	putative ATP-dependent RNA helicase me31b	13.59954	-6.99245	1.491513	-4.68816	2.76E-06
MSTRG.14581	LOC113828898	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form-like	31.79723	-3.42192	0.783658	-4.3666	1.26E-05
MSTRG.3746	LOC113806687	glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1-like	9.232833	-6.43511	1.680503	-3.82928	0.000129
MSTRG.7963	LOC113815132	actin, muscle-like	2363.803	-4.5038	1.186291	-3.79653	0.000147
MSTRG.10303	LOC113820145	chromosome transmission fidelity protein 18 homolog	101.679	-1.72968	0.45605	-3.79273	0.000149
MSTRG.16550	LOC113802698	Friend leukemia integration 1 transcription factor-like	114.6554	-1.80786	0.479746	-3.76837	0.000164
gene24794	LOC113826980	transcriptional regulator ATRX homolog	57.14369	-1.82151	0.528669	-3.44547	0.00057
gene7128	LOC113807421	Rieske domain-containing protein-like	43.09421	-1.75795	0.518657	-3.38943	0.0007
MSTRG.6438	LOC113811975	histidine-rich glycoprotein-like	39.53331	-4.91026	1.485459	-3.30555	0.000948
MSTRG.8864	LOC113817173	monocarboxylate transporter 9-like	94.46992	-2.28358	0.707943	-3.22565	0.001257
MSTRG.6749	LOC113812656	sarcoplasmic calcium-binding protein, beta chain-like	4744.16	-2.56268	0.798058	-3.21115	0.001322
MSTRG.658	LOC113811236	pumilio homolog 2-like	822.4872	-1.99858	0.626408	-3.19054	0.00142
MSTRG.16136	LOC113801857	protein lethal(2)essential for life-like	95.49285	-3.24343	1.018872	-3.18336	0.001456
MSTRG.10580	LOC113820693	alpha-crystallin A chain-like	119.227	-1.91022	0.608973	-3.1368	0.001708
MSTRG.6238	LOC113811586	nudix hydrolase 20, chloroplastic-like	279.6518	-1.71727	0.551421	-3.11427	0.001844
gene12127	LOC113812968	protein big brother-like	11.37498	-3.13496	1.020912	-3.07074	0.002135
gene18256	LOC113819799	spastin-like	10.40813	-2.78404	0.923898	-3.01337	0.002584
MSTRG.5631	LOC113810339	TNF receptor-associated factor 6-like	50.49151	-3.28364	1.093257	-3.00354	0.002669
gene4683	LOC113804731	alcohol dehydrogenase [NADP(+)]-like	4.504587	-5.40806	1.82138	-2.96921	0.002986
MSTRG.2480	LOC113804229	adhesion G protein-coupled receptor B1-like	113.5441	-2.16767	0.731609	-2.96287	0.003048
MSTRG.6763	LOC113812670	sex determination protein fruitless-like	31.32277	-1.84082	0.64007	-2.87596	0.004028
gene12866	LOC113813771	transcription factor ets-4-like	3.867763	-5.19088	1.85295	-2.80141	0.005088
MSTRG.14226	LOC113828166	actin-like	605.6951	-2.3237	0.842374	-2.75852	0.005806
MSTRG.6786	LOC113812706	protein lethal(2)essential for life-like	39.96956	-1.91543	0.697875	-2.74466	0.006057
MSTRG.9656	LOC113818736	actin-like	2431.334	-1.89669	0.700144	-2.709	0.006749
MSTRG.1107	LOC113820612	chlorophyllase-2, chloroplastic-like	24.76548	-3.89776	1.443691	-2.69986	0.006937
MSTRG.6401	LOC113811921	peritrophin-1-like	6.797469	-5.9932	2.256248	-2.65627	0.007901
MSTRG.2303	LOC113803884	protein mesh-like	12.52407	-6.8865	2.597483	-2.65122	0.00802
gene16090	LOC113817379	carbohydrate sulfotransferase 11-like	5.162087	-5.60506	2.199553	-2.54827	0.010826
MSTRG.6930	LOC113813021	actin, cytoplasmic A3a-like	5.492068	-5.70152	2.261135	-2.52153	0.011685
MSTRG.16143	LOC113801859	heat shock protein 67B1-like	1424.092	-1.77433	0.70753	-2.50778	0.012149
gene17631	LOC113819096	unconventional prefoldin RPB5 interactor-like	10.12598	-2.01149	0.802783	-2.50565	0.012223
gene9290	LOC113809794	pecanex-like protein 4	2.938239	-4.79031	1.91986	-2.49514	0.012591
MSTRG.115	LOC113822432	dnaJ homolog subfamily C member 27-like	9.56708	-6.4912	2.603903	-2.49287	0.012671
MSTRG.4773	LOC113808707	probable low-specificity L-threonine aldolase 2	54.24534	-1.59061	0.638155	-2.49252	0.012684
MSTRG.12713	LOC113824712	crustacyanin-A2 subunit-like	81.19466	-2.80468	1.136958	-2.46683	0.013631
gene23712	LOC113825807	E3 ubiquitin-protein ligase TRAIIP-like	10.75821	-2.14136	0.87006	-2.46117	0.013849
gene29318	LOC113801290	serine protease 27-like	5.43649	-3.91562	1.634312	-2.39588	0.01658
MSTRG.12759	LOC113824828	vitellogenin receptor-like	30.24223	-8.15362	3.435463	-2.37337	0.017627
gene5215	LOC113805293	hornerin-like	55.98594	-2.34556	0.989204	-2.37116	0.017732
MSTRG.13026	LOC113825430	glycine-rich cell wall structural protein 1.0-like	35.26621	-6.066	2.571233	-2.35918	0.018315

MSTRG.14306	LOC113828343	RNA-binding protein 42-like	4.610786	-5.43155	2.318042	-2.34316	0.019121
gene21264	LOC113823111	protein no-on-transient A-like	3.973723	-5.2331	2.242745	-2.33335	0.01963
gene4418	LOC113804407	cytoplasmic dynein 2 light intermediate chain 1-like	11.07608	-2.09361	0.912208	-2.2951	0.021728
MSTRG.12347	LOC113823946	hemocyte protein-glutamine gamma-glutamyltransferase-like	55.34195	-1.8645	0.81288	-2.2937	0.021808
MSTRG.10507	LOC113820537	DNA ligase 4-like	12.72383	-1.88592	0.828661	-2.27587	0.022854
gene7040	LOC113807313	transmembrane protease serine 9-like	12.90233	-2.88503	1.270273	-2.27119	0.023135
gene473	LOC113804480	snRNA-activating protein complex subunit 4-like	8.604221	-2.38122	1.049637	-2.26861	0.023292
MSTRG.3405	LOC113806017	cell wall protein DAN4-like	7.676224	-6.18158	2.724941	-2.26852	0.023298
MSTRG.118	LOC113816928	balbiani ring protein 3-like	22.89618	-7.75127	3.435851	-2.256	0.024071
MSTRG.2209	LOC113803689	uncharacterized protein PF11_0207-like	15.65515	-2.1147	0.948571	-2.22935	0.02579
gene26074	LOC113828431	phenoloxidase-activating factor 3-like	6.733269	-4.25278	1.90943	-2.22725	0.02593
MSTRG.14235	LOC113828186	cuticle protein AMP4-like	10.80596	-6.66996	3.037017	-2.19622	0.028076
MSTRG.12760	LOC113824827	prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1-like	6.016678	-5.82486	2.652392	-2.19608	0.028086
MSTRG.5528	LOC113810108	anti-lipopolsaccharide factor-like	24.10191	-2.17779	1.000296	-2.17715	0.029469
MSTRG.12995	LOC113825304	alpha-crystallin A chain-like	16.47597	-3.4656	1.592743	-2.17587	0.029565
MSTRG.14744	LOC113829221	dual specificity protein phosphatase 14-like	73.99438	-2.07515	0.956736	-2.16899	0.030084
gene24236	LOC113826381	post-GPI attachment to proteins factor 2-like	3.898539	-5.18354	2.392652	-2.16644	0.030277
gene5652	LOC113805783	brain protein I3-like	5.67234	-5.73654	2.665322	-2.15229	0.031375
gene18410	LOC113819959	phosphoethanolamine N-methyltransferase-like	18.24427	-2.91103	1.355342	-2.14782	0.031728
MSTRG.7444	LOC113814157	coiled-coil domain-containing protein CG32809-like	22.29113	-1.92743	0.900904	-2.13944	0.0324
MSTRG.10571	LOC113820706	alpha-crystallin A chain-like	4.502276	-3.40632	1.592265	-2.13929	0.032412
gene4857	LOC113804899	U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp3-like	2.301874	-4.44352	2.089928	-2.12616	0.03349
gene2955	LOC113802189	phosphoethanolamine N-methyltransferase 1-like	8.512542	-3.02167	1.423616	-2.12253	0.033793
gene27332	LOC113829816	uncharacterized protein DDB_G0271670-like	7.863846	-2.37065	1.125063	-2.10712	0.035107
MSTRG.4681	LOC113808525	H2.0-like homeobox protein	18.59663	-1.59262	0.75726	-2.10313	0.035454
gene22023	LOC113823940	sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein-like	4.49553	-4.39761	2.108511	-2.08565	0.037011
MSTRG.314	LOC113805477	nicotinamide phosphoribosyltransferase-like	4.264715	-3.55595	1.712217	-2.07681	0.037819
MSTRG.2376	LOC113804034	serine-rich adhesin for platelets-like	39.01438	-1.82268	0.881615	-2.06744	0.038693
MSTRG.762	LOC113813140	actin, muscle-like	117.267	-2.47789	1.202268	-2.06102	0.039302
gene7235	LOC113807539	polyubiquitin 8-like	23.5838	-1.61013	0.782015	-2.05895	0.039499
MSTRG.10317	LOC113820166	decapping and exoribonuclease protein-like	23.11527	-2.78996	1.357886	-2.05463	0.039915
MSTRG.3026	LOC113805286	histidine-rich protein PFHRP-II-like	106.6645	-2.1849	1.075105	-2.03227	0.042127
MSTRG.10561	LOC113820667	carbohydrate sulfotransferase 11-like	9.544113	-2.75583	1.356665	-2.03133	0.042222
gene15766	LOC113817010	patched domain-containing protein 3-like	11.35226	-4.51494	2.232422	-2.02244	0.043131
gene18191	LOC113819726	serine/threonine-protein kinase Pkn1-like	5.283345	-2.49234	1.23822	-2.01284	0.044132
MSTRG.4013	LOC113807236	zinc finger CCHC domain-containing protein 24-like	25.40329	-2.21882	1.103604	-2.01052	0.044376
MSTRG.16496	LOC113802550	triosephosphate isomerase B-like	123.5488	-4.00346	2.003758	-1.99798	0.045719
MSTRG.7967	LOC113815136	actin-like	2028.956	-2.77223	1.391497	-1.99226	0.046342
MSTRG.12951	LOC113825320	alpha-crystallin A chain-like	36.36731	-2.5993	1.309564	-1.98486	0.04716
MSTRG.12712	LOC113824718	crustacyanin-C1 subunit-like	117.3685	-2.12904	1.082509	-1.96676	0.049211
MSTRG.8481	LOC113816341	uncharacterized oxidoreductase MexAM1_META1p0182-like	25.31897	-1.95402	0.99524	-1.96337	0.049604
MSTRG.454	LOC113807030	basic proline-rich protein-like	35.43863	-2.79564	1.425605	-1.96102	0.049877