

1998B - 2005A

CÓDIGO 395494781

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



**Aplicación de la Técnica de Despliegue Diferencial para
evaluar el efecto regulador de la dieta en camarón blanco
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931).**

Tesis para obtener el grado de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta:

MARCO ANTONIO PONCE MÁRQUEZ

Guadalajara, Jalisco, México, Marzo 2007



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología*

1054/ C. C. BIOLOGÍA

C. MARCO ANTONIO PONCE MARQUEZ
PRESENTE


Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: Tesis e Informes opción Tesis con el título: "Aplicación técnica de Despliegue Diferencial para evaluar el efecto regulador de la dieta en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone,1931)" para obtener la Licenciatura en Biología.


Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTÍZ** y el asesor/es es el/la: **DR. JOSE JUAN ZUÑIGA AGUILAR.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 14 de Julio del 2006.


DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


M^{te} en C. ISELA LETICIA ALVAREZ BARAJAS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

BIBLIOTECA CUCBA

Dr. Carlos Álvarez Moya.
Presidente del Comité de Titulación.
Carrera de Licenciado en Biología.

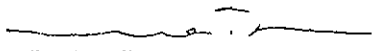
Presente:

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad " **TESIS E INFORME** ", opción " **TESIS** " con el título: " **Aplicación de la técnica de Despliegue Diferencial para evaluar el efecto regulador de la dieta en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)** ", que realizó el la pasante " **Ponce Márquez Marco Antonio** " con número de código " **395494781** " consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otra particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

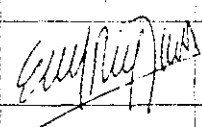
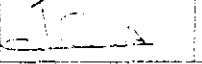
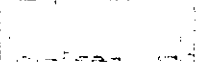
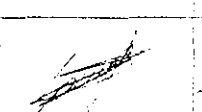
Las Agujas, Zapopan, Jal., 4 de Octubre del 2006.



Dra. María Leticia Arena Ortiz.
Nombre Director (a) del trabajo.
Firma Vo Bo



Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.
Nombre Asesor (a) del trabajo.
Firma Vo Bo

Nombre completo de los síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobación	Fecha de aprobación
Dr. Eduardo Rios Jara		12 mayo 2007
Dr. Carlos Álvarez Moya		12 mayo 2007
Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula		12 mayo 2007
M. C. Gloria Parada Barrera (Suplente)		12 mayo 2007





Universidad de Guadalajara

Aplicación de la técnica del despliegue diferencial para evaluar el efecto regulador de la dieta en camarón blanco
Litopenaeus vannamei

Alumno:

Marco Antonio Ponce Márquez

Director(a) de Tesis:

Dra. María Leticia Arena Ortiz

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor de Tesis:

Dr. José Juan Zúñiga Aguilar

Unidad de Bioquímica y Biología

Molecular de Plantas

Centro de Investigación Científica de Yucatán

Sinodales:

Dr. Eduardo Rios Jara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Universidad de Guadalajara

Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Universidad de Guadalajara

Dr. Carlos Álvarez Moya

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Universidad de Guadalajara

M. C. Gloria Parada Barrera

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Universidad de Guadalajara



DEDICATORIA.

A mis abuelitos:

Por todo lo que han querido ver en sus hijos a pesar de las grandes enseñanzas de la vida.

- *J. Jesús Ponce Parra (†).*
- *Juana Arteaga Delgado (†).*
- *Isabel Márquez Tejeda (†).*
- *Carmen Mora Cuevas.*

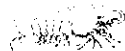
A mis padres:

Por toda la confianza y el gran amor que han depositado en mí.

- *Marco Antonio y María Elba.*

A mis hermanos:

- *Sabás por no declinar ante la tempestad.*
- *Isabel por tu rebeldía incontrolable.*
- *Bibiano por recuperar la unión familiar, haciendo a un lado los recelos.*



AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.

Este presente trabajo se realizó en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación de Sisal de la Facultad de Ciencias, UNAM., y el Centro de Investigación Científica de Yucatán, CICY, bajo la dirección de la Dra. María Leticia Arena Ortiz y la asesoría del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, con el financiamiento de los siguientes proyectos de investigación: UNAM-IN 220502-3, 216406-3; CONACYT 41513-Q., y la beca otorgada por el proyecto PAPIT IN220502-3.

Se agradece la donación de los juveniles de *Litopenaeus vannamei* a Industrias PECIS, SA de CV.

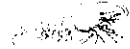
Se agradece a Técnico académico titular "A" M.C. Ramón Souza Perera por el entrenamiento en el desarrollo de técnicas moleculares para la extracción del ARN.

Se agradece a Técnico asociado "C" M.C. José Gabriel Taboada Domínguez por la elaboración de los alimentos balanceados para el experimento.

Técnico académico titular "C" M.C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga por la extracción de tejidos para pruebas moleculares.

Profesor investigador M.C. Alfredo Salas Garza, por darme la confianza para desarrollarme en la maricultura y por capacitarme en el manejo de un laboratorio húmedo.

Profesor investigador Dr. Eugenio Carpizó Ituarte, por transmitir esa energía para observar el desarrollo larval de invertebrados marinos y descubrir la expresión de tejidos que conformarán a un organismo.



AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a todos aquellos profesores que fueron pilares durante mi formación académica.

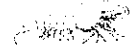
- Miguel Carbajal Soria, por su apoyo incondicional.
- Dra. María del Refugio Mora Navarro, por confiar en mí, asesorarme y apoyarme con la impresión de mis trabajos universitarios.
- Maurilio Espinoza Soto, por enseñarme que la acuicultura es una forma de vida.
- Dr. Juan Gualberto Colli Mull, por su gran amistad y por apoyarme con reactivos en momentos cruciales.
- Candidato a Dr. Gabriel Lizama Uc, por su gran disponibilidad para instruirme en la magia del Despliegue Diferencial.

Así como a mis dos grandes casas que me alimentaron durante una etapa de mi vida.

- A mamá "*Pastora chuc*", por ver en mí un hijo más al ofrecerme todo su cariño de madre y por alimentarme con un sin fin de manjares yucatecos, y a mi hermano Ferneli "el Chuc", por darme trabajo como pescador en su embarcación, para sustentarme como estudiante en el puerto de Sisal, Yucatán.
- A mamá "Linda", por darme un alimento cuando tuve hambre durante mi carrera universitaria y a los hermanos Jaime y Tomas de "la casita" del CUCBA.

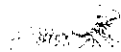
Y a los buenos momentos que pasamos durante esta travesía: "Jaime, Renne y José Luis", así como a varios amigos que se vicieron envueltos con los jalisqueños (Josué, Morris, Gabo, Toño, Chagoya, Mauri, Kizin, Gaby, Gemma, Richard, Chappa, Trabe y el Zotz).

A los amigos del CUCBA por formar parte de mis buenos y malos momentos durante toda mi carrera como universitario.



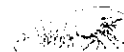
Una misteriosa fuerza trata de convencer de que es imposible realizar la leyenda personal, son fuerzas que parecen ser malas pero en verdad te están enseñando cómo realizarla, están preparando tu espíritu y tu voluntad. Porque existe una gran verdad en este planeta: seas quien seas o hagas lo que hagas, cuando desees con el corazón alguna cosa, todo el Universo conspira para ayudarte a conseguirlo.....es porque nació en el alma del Universo.

PAULO COELHO (*El alquimista*).



ÍNDICE.

	Página
<u>ÍNDICE.</u>	V
ABREVIATURAS.	IX
RESUMEN.	XI
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. <i>Litopenaeus vannamei</i> .	2
1.1.1. Distribución geográfica.	2
1.1.2. Hábitat.	2
1.1.3. Hábito alimenticio.	2
1.1.4. Morfología.	3
1.1.5. Reproducción.	3
1.1.6. Producción.	3
1.2. Despliegue Diferencial.	3
1.2.1. Importancia de la técnica.	4
1.2.2. Inconvenientes de la técnica.	4
1.2.3. Áreas de aplicación.	4
1.3. Expresión Génica.	5
1.3.1. Definición de expresión génica.	5
1.4. Hepatopáncreas.	5
2. ANTECEDENTES.	6
3. JUSTIFICACIÓN.	10
4. HIPÓTESIS.	10
5. OBJETIVO.	10
5.1. General.	10
5.2. Particular.	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1. Experimento Biológico.	11
6.2. Análisis Molecular.	13
6.3. Mezcla de muestras para obtención de ARN total.	13



6.4. Extracción del ARN total mediante una adaptación en la técnica de Valenzuela et al. (2005).	13
6.4.1. Fase de Separación.	13
6.4.2. Precipitación del ARN.	13
6.4.3. 1er. Lavado del ARN.	13
6.4.4. 1er Dilución del ARN.	14
6.4.5. 2ª Precipitación del ARN.	14
6.4.6. 2ª Lavado del ARN.	14
6.4.7. 2ª Dilución del ARN.	14
6.5. Fraccionamiento del ARN en geles nativos de agarosa.	14
6.5.1. Revelar el fraccionamiento del ARN total en gel y fotografiar.	15
6.5.2. Cuantificación del ARN total.	15
6.6. Protocolo para evaluar la concentración del ARN total.	15
6.6.1. Fórmula para calcular la concentración de ARN total.	15
6.6.2. Tratamiento del ARN total con DNasa I.	16
6.7. Desnaturalización del RNA.	16
6.7.1. Síntesis de la 1ª cadena.	16
6.7.2. Comprobar la amplificación de ADNc.	17
6.8. Aplicación del despliegue diferencial (PCR-Differential Display)	17
6.8.1. Preparación de muestra testigo, por caso de contaminación por ADN genómico.	17
6.8.2. Preparación de muestra testigo, para determinar reacciones inespecíficas por cebadores.	18
6.9. Prueba electroforética de poliacrilamida.	18
6.9.1. Preparación de los vidrios.	18
6.9.2. Adhesivo y Repelente para los vidrios de la electroforesis.	19
6.9.3. Aplicación del Adhesivo <i>Bind-Silane</i> para los vidrios de la electroforesis.	19
6.9.4. Aplicación del repelente <i>SIGMA-COTE</i> a los vidrios de la electroforesis.	19
6.9.5. Armado del Sándwich para la electroforesis.	19
6.10. Elaboración del gel desnaturalizante.	20
6.10.1. Cargado del gel (IPC/glass plate Sándwich).	20



6.10.2. Elaboración del amortiguador de corrida electroforética de corrida (solución TBE 1x).	20
6.10.3. Elaboración del amortiguador de carga para desnaturalizar ADNc.	20
6.10.4. Preparar corrida electroforética (DD).	20
6.10.5. Carga de muestras desnaturalizadas.	21
6.11. Lavado de gel desnaturalizante.	21
6.11.1. Fase de Fijación.	21
6.11.2. Fase de Lavado.	21
6.11.3. Fase de Tinción.	21
6.11.4. Fase de Revelado.	21
6.11.5. Fase Neutralizadora.	21
6.12. Protocolo de extracción de bandas de interés.	22
6.12.1. Reamplificación de los ADNc, "diferenciales".	22
6.12.2. Preparación de muestras.	23
6.12.3. Síntesis con cebadores "P" y "T" (a partir de ADN de segunda cadena).	23
6.13. Transformación (protocolo pgem® -t easy vector system 1).	23
6.13.1. Preparación de células competentes.	24
6.13.2. Elaboración de resguardo de plásmidos.	24
6.13.3. Extracción de ADN plasmídico de las bacterias recombinantes.	24
6.13.4. Reamplificación ADNc diferenciales.	25
7. RESULTADOS.	27
7.1. Experimento Biológico.	27
7.2. Análisis Molecular.	28
7.3. Extracción del ARN total.	29
7.4. Extracción de ARN mediante el método de Valenzuela <i>et al.</i> (2005).	30
7.5. Cuantificación del ARN total.	31
7.6. Síntesis de la primera cadena de ADN complementario.	33
7.7. Despliegue Diferencial.	35
7.8. Clonación de los fragmentos diferenciales.	37
7.9. Análisis de restricción de diferentes plásmidos recombinantes.	38
7.10. Corte con la mezcla de enzimas <i>Apa</i> I y <i>Pst</i> I.	38



7.11. Corte con la enzima <i>Not 1</i> .	39
8. DISCUSIÓN.	41
8.1. Experimento Biológico.	41
8.2. Análisis Molecular.	41
8.3. Despliegue Diferencial.	42
9. CONCLUSIÓN.	44
10. REFERENCIAS.	45
11. ÍNDICE DE FIGURAS.	57
12. ÍNDICE DE CUADROS.	58
13. APÉNDICE.	59



ABREVIATURAS

- μL • Microlitro
- % • Unidad de partículas suspendidas en partes por millón
- 18S • Sub unidad ribosomal región 18S del ARN
- 28S • Sub unidad ribosomal región 28S del ARN
- ADN • Ácido Desoxirribonucleico
- ADNc • ADN complementario
- AFLP's • Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados.
- AgNO_3 • Nitrato de plata
- AMPc • Monofosfato de Adenosina cíclico
- BrEt • Bromuro de Etidio
- c/u • Cada uno
- DD • Despliegue Diferencial (Differential Display)
- DDRT-PCR • Despliegue Diferencial de la Reacción de Transcriptasa Reversa seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
- DEPC • Dietilpirocarbonato
- dNTP Mix • Desoxirribonucleótido trifosfato
- DO • (Densidad Óptica) Lectura obtenida por espectrofotómetro a 260nm
- oligo [dT] • Oligo desoxitimidilato (Nucleótido de anclaje en región 3' para ADNc cadena sencilla)
- DTT • Ditioneitol
- *E. coli* • Bacteria (*Escherichia coli*)
- g • gramos
- h • Horas
- Ha • Héctareas
- IPC • (Integral Plate Chamber), Cámara completa con lamina.
- Kb • Kilobases
- L • Litros
- LB • Medio de Cultivo Luria-Bertoni
- M • Molar
- MC • Amortiguador "Multicore"



- min • Minutos
- mL • Mililitro
- mg • Miligramo
- mg/L • Miligramo por cada litro
- N • Normal
- NaOH • Hidróxido de Sodio
- nm • Nanómetro
- O₂ • Oxígeno
- °C • Grados Celsius
- P1T1 • Mezcla de Cebadores P1 y T1
- P9T6 • Mezcla de Cebadores P9 y T6
- P9T7 • Mezcla de Cebadores P9 y T7
- Pb • Pares de bases
- PCR • Reacción en Cadena de la Polimerasa
- Pozas • Agregado o Grupo
- RAP-PCR • Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios en RNA
- RNA • Ácido Ribonucleico
- RNAm • Ácido Ribonucleico mensajero
- rpm • Revoluciones por minuto
- RT • Transcripción Reversa
- RT-PCR • Transcriptasa Reversa seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PAGE • Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida
- seg. • Segundos
- TBE • Tris-Borato-EDTA.
- TM • Tonelada Métrica
- UPS • Unidades Practicas de Salinidad
- UV • Ultra Violeta
- V • Voltaje (Volts)
- W • Watts
- WS • Solución de Lavado (Wash Solution)



RESUMEN

El interés en conocer las modificaciones en las poblaciones de los ARN mensajeros del camarón blanco del Golfo de México (*Litopenaeus vannamei*), mediante la implementación de una técnica que permita percibir la expresión génica de la glándula digestiva (hepatopáncreas), para ser analizados por fraccionamiento electroforético del Despliegue Diferencial en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Por lo que el presente trabajo centró su objetivo en probar una técnica de Biología Molecular para evaluar el posible efecto de la dieta en la expresión genética de camarones pencidos *Litopenaeus vannamei*.

Larvas de *Litopenaeus vannamei* fueron alimentadas desde postlarva 15 hasta juveniles de 65 días, con cuatro diferentes dietas: dos elaboradas con proteína animal al 20% y 40% y las dos restantes con proteína vegetal al 20% y 40%. Las cuales influyeron directamente en la sobrevivencia y el crecimiento de los organismos durante el experimento. El tratamiento #3 dieta con 40% proteína animal produjo el mayor crecimiento.

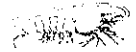
En la sobrevivencia, por un lado no se observó una diferencia entre los tratamientos #2 y #3 (dietas con 20% proteína animal y 40% proteína animal respectivamente). Mientras que por el otro lado el tratamiento #4 (dieta con 40% proteína vegetal) presentó una ligera diferencia respecto del tratamiento #1 (dieta con 20% proteína vegetal).

Los camarones se sacrificaron para la extracción del ARN total de la glándula digestiva o hepatopáncreas de acuerdo con una variación al protocolo de Chomezynski and Sacchi (1987); Valenzuela *et al.* (2005), con el uso de Isopropanol y una mezcla de Citrato de Sodio 0.8 M, comprobando en geles de agarosa al 1%.

Con la finalidad de conocer las adaptaciones que los camarones presentaron en los patrones de la expresión génica al alimentarles con las diferentes dietas, se utilizó la técnica del Despliegue Diferencial descrita por Liang y Pardee (1992). Este análisis no requiere más de 0.2 µg de ARN. Con el uso del Despliegue Diferencial, los resultados obtenidos son similares a los que describe Hlvet *et al.*, (2003).



Se detectó expresión diferencial y se constató de que en por lo menos una de las secuencias de un gen, no correspondió con nada de la base de datos existentes, así la técnica del Despliegue Diferencial fue estandarizada para ser utilizada en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en estudios futuros, lo que además representa un avance para los estudios en crustáceos; en particular al iniciar una línea de investigación novedosa, que vincula la nutrición, la genética poblacional y las herramientas moleculares, en un campo tan importante como lo es la camaronicultura.



1. INTRODUCCIÓN

La demanda del camarón en el mercado internacional y las ganancias que este genera, han requerido del estudio de aspectos nutricionales de estos organismos a fin de obtener alimentos que fomenten un desarrollo adecuado en estos crustáceos bajo condiciones de cultivo (Galindo *et al.*, 2001).

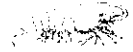
El crecimiento de los crustáceos está determinado por factores intrínsecos y extrínsecos. La talla de los camarones está por un lado genéticamente determinada y por otro depende del aporte alimenticio; para el caso de organismos sometidos a cultivo también influyen factores ambientales y la manipulación artificial (Browdy, 1998).

Litopenaeus vannamei, *Penaeus japonicus* y *Penaeus monodon* son las especies más estudiadas (Fox *et al.*, 1995). Existe la tendencia a asumir que los resultados obtenidos durante el cultivo para las especies antes mencionadas pueden ser extrapolados directamente para otros peneidos; sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo existen diferencias, en muchos casos muy marcadas lo que hace recomendable elaborar el alimento basándose en los requerimientos de la especie a la cual se suministrará (García, 1996).

Uno de los retos de las técnicas modernas de nutrición, consiste en comprender las bases de las diferencias en cuanto a los requerimientos nutricionales; en especial evaluando por un lado las características genéticas de cada individuo o grupo poblacional (De las Cagigas *et al.*, 2002) y por el otro lado evaluando el efecto regulador que los nutrientes tienen sobre la expresión génica (Paoloni *et al.*, 2003).

Las herramientas moleculares son clave en el estudio bidireccional de la interacción entre nutrientes y la expresión de genes, lo cual permite profundizar en el efecto de los nutrientes en la síntesis de enzimas, receptores, transportadores y hormonas (Paoloni *et al.*, 2003).

La interacción entre la nutrición y la expresión génica se puede estudiar en dos sentidos: la influencia que los nutrientes ejercen sobre la expresión génica y la síntesis de proteínas y la influencia de los requerimientos nutricionales. A fin de explicar esas interacciones se han desarrollado diversos estudios: 1) estudios sobre la naturaleza de los genes que son



regulados por factores nutricionales; 2) estudios sobre la determinación de los efectos de factores particulares sobre la regulación de la expresión de los genes y; 3) estudios sobre el entendimiento de cómo se involucra la expresión de genes en el metabolismo y en el aprovechamiento de los nutrientes (De las Cagigas *et al.*, 2002).

En el caso particular del cultivo de camarones la nutrición juega un papel fundamental, debido a que la formulación de los alimentos es la base del éxito de cada una de las fases de desarrollo de estos organismos, además del elevado costo que representa en el total de inversión en la producción, del impacto ecológico de los desechos del alimento y de los productos del metabolismo al medio ambiente. Por esta razón, la tendencia de los últimos años ha sido buscar fuentes alternativas de proteínas y de otros componentes de las dietas con la finalidad de producir alimentos amigables con el medio ambiente (Galindo *et al.*, 2001). Así, el conocimiento de los procesos de nutrición y alimentación permitirá lograr un incremento en la tasa de crecimiento en el cultivo del camarón (Carrillo *et al.*, 2000).

1.1. *Litopenaeus vannamei*

1.1.1. Distribución geográfica:

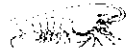
El camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), se encuentra distribuido a lo largo de la costa del Océano Pacífico en México, desde el estado de Sonora hasta llegar a Perú en Tumbes (Pérez-Farfante y Kensley, 1997).

1.1.2. Hábitat:

Tiene una preferencia por fondos con sedimento suave que puede ser desde la línea costera hasta los 72 m de profundidad (Dore y Frimodt, 1987), es una especie eurihalina que va desde cero hasta 50 ups y a una temperatura que va desde 22 °C hasta 32 °C (Pillay, 1997).

1.1.3. Hábito alimentario:

Los camarones peneidos son omnívoros con tendencias carnívoras o herbívoras (Mc Tighe y Zimmerman, 1991). Pero en especial *L. vannamei* tienen hábitos omnívoro herbívoro (Marte, 1980; Hunter y Feller, 1987). Para la digestión del alimento, presenta un tracto digestivo anterior que representa solamente del 2 al 3% del peso corporal (Marte, 1980; Wassenberg y Hill, 1987), ingiriendo su alimento en pequeñas cantidades y consumen una



nueva ración cuando una previa esta siendo digerida (Schwamborn y Criales 2000). Se adaptan muy bien a los cambios en la composición de la dieta mediante la inducción de un conjunto de enzimas digestivas (Le Moullac *et al.*, 1996) sintetizadas y secretadas por la glándula digestiva o hepatopáncreas (Ceccaldi, 1997).

1.1.4. Morfología:

Presenta espinas hepáticas y antenas muy pronunciadas en el cefalotórax con un arreglo de ocho o nueve dientes en el borde superior del rostrum y de uno a dos dientes en el borde inferior (Gamboa, 2001).

1.1.5. Reproducción:

Los machos adultos presentan espermatóforos, estructura compleja de reproducción mientras que las hembras presentan tético abierto, la producción de huevecillos depende del tamaño de la hembra, hembras de 30 g a 45 g de peso producen entre 100 mil y 250 mil huevecillos por desove (Gamboa, 2001).

1.1.6. Producción:

Para 1996 la producción global del cultivo de camarón estuvo cercana a 700.000 TM y provenían de granjas que cubrían una extensión de 1.37 millones de Ha (Rosenberry, 1996). En el continente americano *Litopenaeus vannamei* representó más del 90% de la producción en 1998 cuando alcanzó las 132,000 TM (Rosenberry 1998).

1.2. DESPLIEGUE DIFERENCIAL

Esta técnica se diseñó en el año de 1992 por Peng Lian y Arthur Pardee, como un método para analizar la expresión diferencial de genes mediante PCR con cebadores al azar (Liang *et al.*, 1993). Partiendo de una amplificación de segmentos de ARN mensajero, que proviene de la región terminal 3'-OH, seguido por un fraccionamiento de segmentos de los ADNc amplificados en un gel de secuenciación. Primeramente se obtiene un ADNc de cadena sencilla por transcripción reversa (RT) mediante el uso de cebadores oligo (dt), los cuales contiene un nucleótido de anclaje en la posición 3', mientras que los cebadores se anclan en posición 5' del ARN mensajero, específicamente en la cola poli-A (Roman *et al.*, 1997). La amplificación del ADNc mediante PCR se realiza por el uso de un cebador de



anclaje y un cebador con secuencia arbitraria. Las secuencias de ADNc (productos) corresponden a fragmentos de los extremos 3' del ARN mensajero, que en general son menores de 100 pb, aunque no exclusivamente. Los productos del PCR se fraccionan por electroforesis mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida, observándose por detección de fluorescencia o por autoradiografía. Otra opción es la tinción con plata, que permite hacer una detección de las bandas amplificadas de forma directa en el gel, además de que se puede cortar para la extracción de la banda genética de interés para su reamplificación y su ligación en vectores plasmídicos (Pienta and Schwab, 2000).

1.2.1. Importancia de la técnica:

El despliegue diferencial es empleado para analizar la expresión de genes en una muestra cuyo genoma no se ha conocido, una técnica simple y aplicable a muestras de cualquier origen, que requiere tan solo 0.2 µg de ARN para aplicarse (Pienta and Schwab, 2000). Los cambios de expresión se pueden evaluar directamente desde el primer paso, en un gel de poliacrilamida. Además, esta técnica permite la detección de genes que se reprimen, se inducen o que modifican simplemente sus niveles de expresión como respuesta a los factores de estudio. Otra ventaja es la de poder clonar estos fragmentos para conocer su secuencia y su uso para la generación de sondas para el escrutinio de bancos de ADNc, que a su vez permite mediante el northern blot o ensayos de protección a nucleasas monitorear los niveles de transcripción (Zúñiga y Godoy, 2005).

1.2.2. Inconvenientes de la técnica:

Un inconveniente experimental es el elevado número de análisis necesario para estudiar los cambios totales en la expresión de genes de una muestra y la cantidad elevada de falsos positivos que se presentan (Matz and Lukyanov, 1998; Hlvet *et al.*, 2003; Sánchez, *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004; Vieites *et al.*, 2005).

1.2.3. Áreas de aplicación:

El despliegue diferencial se ha utilizado en diversas áreas de estudio como lo es la biología del desarrollo, la biología de las células y de tumores, en inmunología, así como en otras áreas de especialización en la que los biólogos buscan comprender la expresión de genes diferenciados (Matz and Lukyanov, 1998).



1.3. EXPRESIÓN GÉNICA.

La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos procariontes y eucariontes transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento. En todos los organismos, inclusive los eucariontes el contenido del ADN de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células y son conocidos como genes de mantenimiento. El resto de los genes se expresan o no en los diferentes tipos de células, dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de éstos (Zúñiga y Godoy, 2005).

1.3.1. Definición de expresión génica:

Un proceso altamente específico en el cual un gen se "enciende" en un momento determinado y comienza la producción de su proteína (De la Cagigas *et al.*, 2002; <http://www.genome.gov/sglossary>).

1.4. Hepatopáncreas:

En camarones juveniles de *Litopenaeus vannamei*, se estima que la glándula digestiva o hepatopáncreas corresponde al 4.4 ± 0.02 % (Gaxiola *et al.*, 2005) del peso total en fresco del animal, y se conoce como índice hepatosomático. Este órgano presenta tres funciones principales: 1) secreción y síntesis de enzimas digestivas, 2) retención temporal y cíclica de reservas y 3) la absorción de nutrientes productos de la digestión (Gibson y Barker, 1979; Rosas *et al.*, 2000). La estructura de las células digestivas del hepatopáncreas en crustáceos, fue descrita por estudios previos mediante microscopía electrónica (Jacobs, 1928; Hirsch and Jacobs, 1928; Al-Mohanna *et al.*, 1985"), definiendo cinco tipos de células: E (embrionarias), F (Fibrilares), B (con forma de ampula o de almacenamiento), M (enanas o secretoras) y R (receptivas o absorción). Vogt *et al.* (1989) sugiere que todas las células presentes en la glándula digestiva derivan de las células E y células B.



2. ANTECEDENTES

El factor alimento en el cultivo del camarón representa más del 60% de los costos de producción, por lo que se trata de un tema de gran relevancia para los productores. Además de los costos, los alimentos tienen que poseer propiedades específicas como el olor, la textura, el sabor y propiedades físicas como el tamaño de partícula. Los alimentos deben contener todos los nutrientes esenciales para los organismos cultivados, deben ser costeables, con alta digestibilidad que permita la asimilación de los nutrientes y poco contaminantes (Akiyama *et al.*, 1992; Sarac *et al.*, 1993; Sudaryono *et al.*, 1995).

Por otra parte, desde hace ya varias décadas, en la industria de la fabricación de alimentos balanceados para camarón se han empleado fuentes de proteína vegetal (Tacon, 1990; Tacon and Akiyama, 1997). La posibilidad de la inclusión de estas materias primas se debió esencialmente a que una de las especies más herbívoras (*Litopenaeus vannamei*) ha sido seleccionada para su cultivo a nivel mundial. Muy diversas materias primas de origen vegetal (harina de soya, harina de chícharo, pasta de soya, gluten de trigo, etc.) han sido usadas para sustituir la harina de pescado para abaratar los costos de producción del cultivo de camarón. Tanto en el alimento natural como en las dietas diseñadas y preparadas en el laboratorio, las proteínas son el ingrediente más abundante, éstas juegan un papel muy importante en el crecimiento y el desarrollo de los camarones (Smith *et al.*, 1985; Sudaryono *et al.*, 1995; Lemos *et al.*, 2000).

Por lo tanto, entender la digestión, los requerimientos y la respuesta a diferentes fuentes de proteínas, y el reparto de energía asociado a la alimentación es relevante en el proceso de producción de camarones. Ya que durante el ciclo de vida de los peneidos, existen cambios de morfología y desarrollo, con cambios de hábitos alimenticios de la herbivoría a la omnivoría, estos cambios ontogénicos están acompañados de cambios significativos en las tasas metabólicas y en las actividades de las enzimas digestivas (Lovett and Felder, 1990; Chu and Koulikowsky, 1994; Laubier-Bornichon *et al.*, 1977; Lemos *et al.*, 1999).

Dado que la supervivencia y el funcionamiento de los organismos depende de la disponibilidad ambiental del alimento, existe una dependencia del funcionamiento de la



maquinaria transcripcional con los nutrientes. En este sentido los nutrientes pueden influenciar el desarrollo o la selección de determinados genotipos en los individuos (Paoloni *et al.*, 2003). Es por esta razón que las condiciones de cultivo juegan un papel muy importante en la calidad final del producto, y la alimentación es un factor crucial pues se ha observado que los cambios en el peso, en la talla y en la textura del tejido están relacionados con las características del alimento, incluyendo la concentración de proteína en la dieta (Ezquerro *et al.*, 2003).

El crecimiento total y en algunos casos el tamaño de las células están también afectados por la disponibilidad de nutrientes. Muchos organismos han desarrollado estrategias especiales de sobrevivencia en periodos de deficiencias alimentarias (Bohni *et al.*, 1999).

La presencia del exoesqueleto viejo y la síntesis del nuevo exoesqueleto es el resultado de un complejo conjunto de mecanismos, en el centro de los cuales esta la activación de genes específicos mediados por los ecdisteroides, estos son hormonas esteroideas existentes en los artrópodos, específicamente en crustáceos que regulan la muda ecdisona (α -ecdisona) y 20-OH ecdisona (β -ecdisona), durante un proceso dependiente de la síntesis proteica y que es inhibido por la hormona inhibidora de la muda, mediado por un aumento del AMPc (Adenosin Monofosfato cíclico) y antagonizado por el sistema calcio-calmodulina). Se ha postulado que una pequeña liberación de la hormona dispara la transición de la expresión genética de la intermuda a la premuda (Huberman, 1990).

Cruz Suárez y Guillaume (1987) encontraron un efecto estimulador del crecimiento en la harina de calamar en dietas para *Penaeus japonicus*. Los autores separaron tres fracciones de calamar fresco y encontraron que la fracción proteica estimuló el crecimiento sin aumentar el consumo. Al tratar de explicar el mecanismo de acción encontraron que el contenido total del DNA de los camarones no cambiaba pero el de RNA y la relación RNA/DNA variaba en el mismo sentido que la ganancia de peso, por lo que sugirieron que esta última era debida a una hipertrofia de los células y no a una hiperplasia (Carrillo *et al.*, 2000).



Si bien las técnicas de biología molecular se han desarrollado en los últimos años, los mecanismos relacionados con la expresión genética no están del todo estudiados en los camarones; sin embargo, se sabe que los aminoácidos pueden jugar un papel importante en la modulación de la expresión de ciertos genes, en el control de la transcripción y la estabilización del ARN mensajero (ARNm) fungiendo como un modulador. Por consiguiente, el conocimiento de los mecanismos de regulación de la expresión proteica contribuirá al conocimiento de las bases moleculares de la regulación de procesos como el crecimiento (Huberman, 1990).

Los niveles de expresión génica se pueden analizar a nivel proteico, midiendo la cantidad o la actividad de producto génico producido, o bien a nivel del ARN mensajero. Los niveles de ARNm de un gen concreto no dependen sólo del ritmo al que se transcriba, sino también de la vida media de la molécula y del ritmo en que se degrade. Por otro lado, la traducción proteica también puede estar regulada, haciendo que los niveles de ARNm no sean extrapolables a los niveles de proteína producida. La tecnología del ADN recombinante hace mucho más fácil analizar los niveles de ARNm que los de proteína, por lo que se ha generalizado la medición de ARNm como indicador del nivel de expresión génica. Por esto es que ha existido gran interés en analizar, en paralelo, respuestas globales de los niveles de transcripción de todos los genes a un determinado cambio ambiental (De Risi *et al.*, 1997).

La expresión génica es un proceso muy complejo mediante el cual se logra la síntesis de una cadena polipeptídica a partir de la información hereditaria, contenida en un gen correspondiente. Potencialmente, la expresión de un gen puede ser regulada en cualquiera de las etapas que transcurren desde su transcripción hasta la síntesis de la proteína y la manifestación de su actividad y está influenciado entre otros factores por el estado nutricional del individuo (De las Cagigas *et al.*, 2002).

El método de análisis de la expresión diferencial de Genes mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando cebadores con secuencias aleatorias (Differential Display) es una herramienta de la Biología Molecular desarrollada para estudiar la expresión génica, se puede aplicar a muestras de cualquier origen y tamaño y los cambios de la expresión se pueden evaluar directamente desde el primer paso. Esta técnica puede ser



empleada en muestras cuyo genoma no es conocido y también analizar genes ya conocidos (Vieites *et al.*, 2005). El identificar genes individuales puede permitir determinar una relación de funciones, para genes específicos, con procesos del desarrollo, y con actividades metabólicas o moleculares (Kozian and Kirschbaum, 1999).

Estudios sobre enzimas digestivas en hepatopáncreas de crustáceos, afirman que la actividad enzimática está en función de la alimentación, tal y como lo demostró Hirsch and Jacobs (1928) en estudios histo-químicos con *Astacus leptodactylus*, midiendo la actividad de la caseína, de la amilasa y de la peroxidasa. Estas actividades fluctúan rítmicamente por naturaleza, sin embargo, llegan a presentar dos picos de incremento al haber transcurrido casi 6 horas de la ingesta de alimento, esta regulación se alcanzaría vía transcripcional o post transcripcional por los numerosos cambios que sufre el ARN de las enzimas digestivas en las células. El ARNm sería un índice de respuesta de los cambios almacenados por el ARN de las enzimas digestivas en las células, generado por el alimento (Lehnert and Johnson, 2002).

Otros estudios, como en salmones por Torstensen *et al.* (2006), en metabolismo y la asimilación de lípidos de origen vegetal, buscan comprender la expresión de genes del ARNm en hígado. En el bacalao del atlántico, Froystad *et al.* (2006) centraron su interés en el factor que dispara la expresión génica del ARNm del intestino, con el uso de harina de pescado y de soya en su alimentación.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo tiene el objetivo de conocer si la técnica de Despliegue Diferencial para el ARN revela diferencias en la expresión génica en camarones *Litopenaeus vannamei* como resultado de la alimentación con distintas dietas.



3. JUSTIFICACIÓN

El establecimiento de un protocolo para estimar la expresión diferencial asociada a las dietas en camarones permitirá aportar conocimiento fundamental en el campo que vincula los estudios de nutrición y de la genética en la camaronicultura.

4. HIPÓTESIS

La expresión génica de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) presentará cambios en las poblaciones de ARN mensajeros como resultado de la alimentación con diferentes dietas.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Estandarizar y probar la técnica de Despliegue Diferencial para mostrar cambios en el ARN mensajero en camarones (*Litopenaeus vannamei*) como diferencias en la expresión génica resultado de la alimentación con distintas dietas.

5.2 Particulares

1. Estandarizar la técnica de Despliegue Diferencial para camarones.
2. Probar cuatro dietas artificiales en camarones (*Litopenaeus vannamei*) con distintos % de proteína de origen animal o vegetal en su composición.
3. Evaluar los cambios presentes en los ARN mensajero de la glándula digestiva "hepatopáncreas" mediante la técnica del Despliegue Diferencial.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue dividido en dos partes: 1ª parte (Experimento Biológico) observando la respuesta de los camarones ante la dieta suministrada y 2ª parte (Análisis Molecular) identificando cambios en el ARN mensajero de la glándula digestiva (hepatopáncreas), para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*).

6.1. Experimento Biológico.

Los organismos se colocaron en un sistema semicerrado de flujo continuo de recirculación en un ambiente bajo condiciones controladas. Con temperatura del agua promedio de 29 ± 1.5 ° C, salinidad de 36 ± 1 ‰, concentración de Oxígeno > 6 mg/L y recambio de agua de 50 %-70 % diario.

El sistema (Figura 1), funciona con un tanque colector de 400 litros, este reservorio colecta el agua de retorno del sistema, tratándola con luz UV, en el reservorio se utiliza un espumador, para facilitar la liberación de restos de comida concentrados en el sistema.

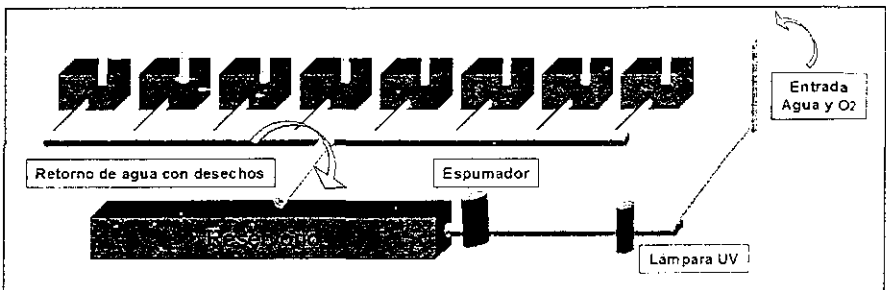


Figura 1 Sistema de experimentación para el mantenimiento del camarón blanco (*L. vannamei*)

En tinas de 40 L se colocaron 20 postlarvas de camarón, dos tinas por cada tratamiento y se alimentaron ad libitum con el 20% de su biomasa distribuida en tres raciones, mediante dietas artificiales rica en proteína (Cuadros 1 y 2), formulada en el laboratorio de Nutrición.



Cuadro 1 Composición de dietas artificiales para probarse en *L. vannamei*

Elementos de la dieta	% de la dieta.
• Concentrado proteico de pescado	• 4.5
• Gluten de trigo	• 7
• Lyzamina.	• 0
• Espirulina	• 4.5
• Concentrado de Soya	• 15
• Canola.	• 0
• Premezcla vitaminica	• 1
• Vitamina C	• 0.45
• Carofila	• 0.015
• Colesterol	• 0.5
• Lecitina.	• 2
• Aceite de hígado de bacalao.	• 6
• Almidón	• 40
• Alginato	• 1
• Talco	• 18.035

Los camarones se sometieron a un periodo de adaptación a las dietas artificiales en cada uno de los tratamientos por 15 días y se alimentaron hasta alcanzar los 65 días, los camarones se sacrificaron para la extracción de la glándula digestiva (hepatopáncreas).

Cuadro 2 Dietas artificiales probadas con cuatro tratamientos para camarones de (*L. vannamei*).

Tratamiento	(1)	(2)	(3)	(4)
Dietas	Proteica (20 % Vegetal)	Proteica (20 % Animal)	Proteica (40 % Animal)	Proteica (40 % Vegetal)



6.2. Análisis Molecular.

Obtención de fuentes para electroforesis.

La glándula digestiva fue inmediatamente congelada en nitrógeno líquido de forma individual y manteniéndose a -30 °C hasta su análisis.

6.3. Mezcla de muestras para obtención de ARN total.

Con la finalidad de obtener la mayor información posible y no medir variaciones individualmente, se decidió hacer mezclas de tejidos con más de una glándula digestiva (genoma acumulado) correspondiente a 8 camarones alimentados con una misma dieta. Las glándulas fueron pesadas en una balanza analítica ohaus (Modelo 250L) y se maceraron los tejidos en contacto con nitrógeno líquido.

6.4. Extracción del ARN total mediante una adaptación en la técnica de Valenzuela *et al.* (2005).

6.4.1. Fase de separación.

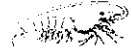
- Adicionar un mL de trizol por cada 100 mg de muestra macerada.
- Adicionar 200 µL de *Cloroformo* por cada mL de trizol utilizado en el tejido.
- Agitar por 10 seg.
- Centrifugar a 4 °C, por 10 min a 10,000 rpm.
- Obtener toda la fase clara acuosa superior =sobrenadante.

6.4.2. Precipitación del ARN.

- Adicionar 500 µL de *Isopropanol* por cada mL de Trizol utilizado.
- Mezclar un mL de mezcla de *Citrato de Sodio* (0.8 M) y *Cloruro de Sodio* (1 M) por cada mL de *Isopropanol*, relación 1:1.
- Agitar suavemente.
- Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 4 °C por 10 min a 12,000 rpm.

6.4.3. 1er. Lavado del ARN.

El ARN precipitado en el fondo en un botón o pastilla.



- Retirar el *Isopropanol* y la mezcla de *Citrato de Sodio* (0.8 M), con *Cloruro de Sodio* (1 M).
- Lavar ARN con 1000 μL *Etanol* al 80 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por muestra.
- Centrifugar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min a 12,000 rpm.

6.4.4. 1er. Disolución del ARN.

Retirar *Etanol* al 80 % y adicionar lo siguiente:

- En 50 μL de agua ultra pura a $50\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 125 μL de *Cloruro de Litio* (4 M)
- Incubar por 2h a temperatura ambiente o $1\frac{1}{2}\text{ h}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4.5. 2ª Precipitación del ARN.

- Centrifugar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min a 10,000 rpm.
- Retirar todo el sobrenadante.

6.4.6. 2ª Lavado del ARN.

- Lavar la pastilla con 200 μL *Etanol* al 80 % a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Centrifugar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min a 10,000 rpm.
- Retirar sobrenadante, no tirar la pastilla.

6.4.7. 2ª Disolución del ARN.

Hidratar la pastilla con *Agua ultra pura* a $50\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3-5 min.

6.5. FRACCIONAMIENTO DEL ARN EN GELES NATIVOS DE AGAROSA.

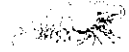
Muestra de ARN para correr en gel de agarosa al 1% con 1 μL de bromuro de etidio.

Preparación de muestras de ARN a cargar en gel de Agarosa.

Preparación de *ARN total muestra N°4*, se cargo intercalando la siguiente concentración:

- 1 μL ARN + 4 μL Buffer de carga (amortiguador 2X).
- 3 μL ARN + 4 μL Buffer de carga (amortiguador 2X).
- 4 μL ARN + 4 μL Buffer de carga (amortiguador 2X).

Se elaboró en un fraccionamiento electroforético a 90 V, por 30 min.



6.5.1 Revelar el fraccionamiento del ARN total en gel y fotografiar.

- Revelar el gel con transiluminador de luz ultra violeta (VILBER LOURMAT, № Serie V03-8751. Rango 312-254 nm).
- Fotografía digital con cámara (KODAK™, EDAS 290)
- Editar imagen con programa Kodak 10 Imagen Análisis Software, versión (3.6). Eastman Kodak Company. Rochester, NY 14650 (IB5431010-11/02).
- NOTA: Esta misma metodología fue repetida durante la extracción de ARN total en todos los tratamientos.

6.5.2. Cuantificación del ARN total.

Se tomaron tres lecturas a diferentes longitudes de absorbancia, con un pico máximo de absorbancia a 260 nm (Zúñiga y Godoy, 2005).

6.6. Protocolo para evaluar la concentración del ARN total.

En espectrofotómetro "GENESYS 10UV" (Catalogo 335902).

- Calibrar celda de cuarzo con agua destilada (1000 µL), y tomar lecturas a 230 nm, 260 nm y 280 nm.
- Aforar a un volumen final de 3000 µL. (3 µL ARN total + 1997 µL agua destilada).
- Tomar lecturas de muestras de ARN total a 230 nm, 260 nm y 280 nm.

6.6.1. Fórmula para calcular la concentración de ARN total.

Cuadro 3. Fórmula para evaluar la concentración de ARN total en lecturas a 260 nm

$$\left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right) \text{ de ARN} \longrightarrow \frac{(\text{DO } 260 \text{ nm}) (40 \mu\text{g/mL de ARN}) (3 \text{ mL})}{(3 \mu\text{L})}$$

- DO 260 nm.....Lectura obtenida por el espectrofotómetro 260 nm.
- 40 µg de ARN/mL.....Factor de concentración empírico a 260 nm.
- 3 mL.....Volumen total presente de la cubeta de cuarzo.
- 3 µL.....Volumen total de absorción para la solución de ARN total.
- Resultados de conversión para lectura a 260nm.



6.6.2. Tratamiento del ARN total con DNasa I.

Colocar 25 μL de ARN total por muestra en tubos.

Elaborar mezcla de la siguiente forma:

- (10X DNase Buffer)..... 0.1 Volumen de ARN total a tratar.
- (DNase I, RNase-free (2 units/ μL))..... 1 μL
- Mezclar suavemente (con pipeta)
- Incubar a 37 °C, de 20-30 min
- Realizar fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa al (7 %)
- Cargar muestras (0.9 μL ARN + 4 μL Buffer de carga) "amortiguador 2X".

6.7. Desnaturalización del RNA.

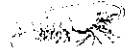
Se efectuó de acuerdo al protocolo N° 18080-93 de la casa Invitrogen™ para la enzima SuperScript™ III (RT-PCR), en tubos para PCR de la siguiente forma:

- 1 μLOligo (dT)₂₀. (Catálogo 18418-20).
- 1 μL10 mM dNTP Mix. (Catálogo 18427-013).
- 13 μLAgua Sigma (RNase-free).
- 1 μLARN total de la muestra tratada (DNA-free), volumen final 16 μL .
- Mezclar suavemente
- Pasar a PCR, "Thermo hybrid Px2" (N°-Serie 34214) a 65 °C por 5 min.
- Colocar muestras en hielo por 1min.

6.7.1 Síntesis de la 1ª cadena.

Para un volumen final de 6 μL , un tubo para PCR, mezclar (con ayuda de pipeta), realizar de la siguiente forma:

- 4 μL5 X Firts-Strand Buffer
- 1 μLDTT (0.1 M)
- 1 μLSuperScript™, III RT (200 units/ μL)
- Incubar muestra en termociclador (PCR) a 50 °C, por 60 min.



6.7.2. Comprobar la amplificación de ADNc.

- En tubo Eppendorf de 2 mL.
- Agregar 20 μ L de agua ultra pura (*RNase-free*) por cada 4 μ L de cDNA.
- Aforar a un volumen final de 40 μ L
- Almacenar a -20°C hasta que se requiera su uso.
- Tomar alicuota.
- Fraccionar muestras electrofóreticamente con gel de agarosa al 7%, a un voltaje de 80 v por 25-30 min.
- Revelar en transiluminador de UV.
- Fotografiar.

6.8. Aplicación del despliegue diferencial.

Se utilizaron cebadores arbitrarios (P) y cebadores de anclaje con una sola base (T).

En tubos para PCR de 500 μ L elaborar mezcla de la siguiente forma:

- 1 μ L de cDNA elaborado en la síntesis de 1^a cadena (punto 6.7.1)
- 1 μ L cebador (P)
- 1 μ L cebador (T)
- Mezclar con pipeta.
- Enzimas y amortiguador (*)

Nota: *Combinaciones de cebadores utilizados (P1T1, P9T6 y P9T7) y 18 μ L (PCR Mix)

Esta metodología se estandarizó con la muestra #3 contra el control (Camarón adulto alimentado con dieta comercial)

6.8.1. Preparación de muestra testigo negativo para caso de contaminación por ADN genómico.

- En tubo para PCR (500 μ L).
- 1 μ L ARN total (de donde se extrajo el ADNc).
- 1 μ L cebador (P).
- 1 μ L cebador (T).
- Mezclar con pipeta.



- Enzimas y amortiguador (*)

Nota: *Combinaciones de cebadores utilizados (P1T1, P9T6 y P9T7) y 18 μ L (PCR Mix).

Esta metodología se estandarizó con la muestra #3 contra el control (Camarón adulto alimentado con dieta comercial).

6.8.2. Preparación de muestra testigo para determinar reacciones inespecíficas por cebadores.

- En tubo para PCR (500 μ L).
- 1 μ L Agua Sigma (*RNase-free*).
- 1 μ L cebador (P).
- 1 μ L cebador (T).
- Mezclar con pipeta.
- Enzimas y amortiguador (*)

Nota: *Combinaciones de cebadores utilizados (P1T1, P9T6 y P9T7) y 18 μ L (PCR Mix).

Esta metodología se estandarizó con la muestra #3 contra el control (Camarón adulto alimentado con dieta comercial)

6.9. Prueba electroforética de poliacrilamida.

Se utilizó una cámara electroforética BIO-RAD, "Sequi Gen Cell" (21x50), N°- Serie 366BR4151 (3000VCD), y el *Catalogo (K1810-1) del protocolo (PT1173-1), versión (PR19324)*.

6.9.1. Preparación de los vidrios.

Lavar vidrios en tres pasos:

- 1.- Con NaOH 0.2 N.
- 2.- Con agua destilada.
- 3.- Con Etanol al 70 %.

Secar a temperatura ambiente (evitar el polvo).



6.9.2. Adhesivo y Repelente para los vidrios de la electroforesis.

Preparar adhesivo *BIND-SILANE*.

En tubo Eppendorf de 1000 μ L mezclar:

- 900 μ L de agua ultra pura (*RNase-free*).
- 10 μ L Adhesivo (*Bind-Silane*) № 2530-85-0.

6.9.3. Aplicación del Adhesivo *BIND-SILANE* para los vidrios de la electroforesis.

Aplica adhesivo con pipeta en dos pasos:

- a) Distribuir de manera paralela al borde del vidrio.
- b) Distribuir adhesivo en forma de "S".
 - Secar a temperatura ambiente durante 15-20 min.
 - No exponerlo a corrientes de aire.

6.9.4. Aplicación del repelente *SIGMA-COTE* a los vidrios de la electroforesis.

- Aplicación de 1000 μ L *SIGMA-COTE* con pipeta de la siguiente forma en dos pasos:
 - a).- Aplicar de manera paralela al borde del vidrio.
 - b).- Distribuir en forma de "S".
 - Secar a temperatura ambiente durante 15-20 min
 - No exponerlo a corrientes de aire.

6.9.5. Armado del Sándwich para la electroforesis.

- Untar vaselina a separadores.
- Colocar separadores entre vidrios.
- Poner vidrios dentro de molde IPC/glass plate Sandwich.
- Colocar clips sobre vidrios.
- Alinear vidrios.
- Sujetar vidrios a base de ensamble del IPC.
- Colocar peine de forma invertida.
- Verificar el correcto alineamiento de vidrios en la base de ensamble del IPC.



6.10. Elaboración del gel desnaturalizante.

- Disolver 29.4 g de urea (7 M), en 14 ml (TBE 5X).
- Agregar 10 mL de agua destilada.
- Filtrar la solución en embudo de porcelana y pasarla por papel filtro con bomba de vacío a un matraz de 100 mL.
- Adicionar 10.5 mL de la solución de acrilamida (6 % acrilamida-bis- 40 % acrilamida).
- Desgasificar con bomba al vacío por 3 min, mezclando la solución.
- Aforar solución a 70 mL con agua destilada.
- Adicionar 200 μ L TEMED, catalogo 161-0801 (BIO-RAD)
- Mezclar hasta disolver y agregar 400 μ L de persulfato de amonio al 10 %.

6.10.1. Cargado del gel IPC/glass plate Sándwich.

- Llenar con el gel desnaturalizante el IPC/glass plate Sándwich.
- Dejar polimerizar por 4 h.

6.10.2. Elaboración del amortiguador de corrida electroforética (solución TBE 1x).

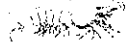
- 400 mL de amortiguador TBE 5x y aforar a 2 L con agua destilada.
- Mezclar la solución.

6.10.3. Elaboración del amortiguador de carga para desnaturalizar ADNc.

- En tubo para PCR 500 μ L.
- Adicionar 10 μ L de cADN por cada 5 μ L de Buffer desnaturalizante.
- Desnaturalizar en termociclador a 95 °C por 5min.
- Colocar en hielo hasta su uso.

6.10.4. Preparar corrida electroforética (DD).

1. El gel de polimerización se coloca en la base de soporte del IPC/glass plate Sándwich.
2. Llenar con amortiguador de corrida y extraer el peine.
3. Marcar las pozas para facilitar la carga.
4. Precaentar gel a 50 W ó 1751 Volts hasta alcanzar 40 °C – 50 °C.



6.10.5. Carga de muestras desnaturalizadas.

- Precalentar el IPC/glass plate Sandwich a 40 °C – 50 °C.
- Retirar la cobertura de seguridad (GT-TOP).
- Lavar pozas con amortiguador de corrida por varias ocasiones antes de cargar.
- Cargar poza por poza limpiando previamente la urea que se deposita en las pozas.
- Desarrollar el fraccionamiento electroforético a un voltaje de 50 W por 4-5 h o hasta que el azul de Xilencyanol haya migrado todo el gel.

6.11. Lavado de gel desnaturalizante.

Se utilizo el siguiente protocolo *PT1173-1*, (*PROMEGA PR19324*).

6.11.1. Fase de Fijación.

- Utilizar una tina con tapa.
- Colocar sobre una agitadora “Plataforma oscilante VWR”.
- Agregar solución con ácido acético (*Fix-Stop*).
- Lavar gel por 20 min o hasta que el colorante desaparezca.

6.11.2. Fase de Lavado.

- Retirar el acido acético.
- Lavar 3 veces con agua destilada por 2 min.

6.11.3. Fase de Tinción.

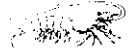
Lavar con solución de plata (*Staining Solution*) por 30 min en agitación constante.

6.11.4. Fase de Revelado.

- Lavar con agua destilada por 30 seg.
- Lavar con solución reveladora por 5 min o hasta que las bandas ya estén presente.

6.11.5. Fase Neutralizadora.

- Retirar solución reveladora
- Lavar con ácido acético 2 min.



- Lavar tres veces con agua destilada por 2 min, c/u de las muestras.
- Secar a temperatura ambiente.
- Identificar bandas diferenciales y se cuantificar (en transiluminador), de luz blanca.

6.12. Protocolo de extracción de bandas de interés.

Con una navaja/bisturí, cortar las bandas diferenciales y colocar en tubos de (1000 μ L) y seguir la siguiente metodología:

1. Rotular los tubos.
2. Centrifugar bandas 10 seg.
3. Hidratar bandas en agua ultra pura (ADN-Free), por 30 min.
4. Calentar muestras a 100 °C, por 5 min. (termo-block, baño María ó PCR).
5. Enfriar a temperatura ambiente 1 h.
6. Centrifugar por 10 seg.
7. Extraer solución en tubos para PCR de 500 μ L.

6.12.1. Reamplificación de los ADNc “diferenciales”.

La síntesis de primera cadena (ADNc), a partir de los productos de bandas de interés, se realizó de la siguiente forma:

- 1 μ L.....Oligo (dT)₂₀, (Catálogo 18418-20).
- 1 μ L.....10 mM dNTP Mix. (Catálogo 18427-013).
- 9 μ L.....Agua ultra pura (*RNase-free*).
- 1 μ L.....ADN (Producto de bandas cortadas).
- Correr PCR a 65 °C por (5 min), colocar en hielo y adicionar lo siguiente:
- 4 μ L.....5X First-Strand Buffer.
- 2 μ L..... DTT (0.1 M).
- Mezclar y dejar incubar por 2 min, a 37 °C.
- Adicionar 1 μ L. de enzima (M-MLV-RT) e incubar por 1 h.
- Verificar síntesis de primera cadena en gel de agarosa al 2 %.



6.12.2. Preparación de muestras.

En Parafilm preparar cada 3 μL de amortiguador de carga + 4 μL con cada muestra de ADN primera cadena.

6.12.3. Síntesis con cebadores “P” Y “T”, (a partir de ADN de segunda cadena).

Elaborar mezcla nueva en tubos de PCR de 500 μL la siguiente mezcla:

- 2 μL (Oligo P)
- 2 μL (Oligo T)
- 16 μL (PCR Mix)
- 10 μL (ADN de 1er cadena) Para c/u de las muestras
- Correr PCR (Cuadro 4).
- Colocar en hielo las muestras.
- Comprobar expresión de bandas en gel de agarosa al 2 %.
- Cargar muestras de ADN 5 μL con 3 μL de amortiguador de carga.
- Correr fraccionamiento electroforético a 90 volts, por 20-30 min.

Cuadro 4. Programa de PCR, para correr la síntesis de primer cadena en muestras de ADN de (*L. vannamei*).

Nº de Ciclos	Temperatura de amplificación	Tiempo de amplificación
1	94 °C (Desnaturalización)	5 min
30	94 °C (Desnaturalización)	1 min.
	60 °C (almacenados)	1 min.
	68 °C (Polimerización)	2 min.
35	68 °C	10 min.

6.13. Trasformación (protocolo pgem® -t easy vector system 1).

1. En tubos de 1000 μL preparar reacción.
2. Trasformación por toda la noche a 4 °C o a 1½ hr a temperatura ambiente.
3. Se utilizó la bacteria *E. coli* One Shot TOP 10.



6.13.1 Preparación de células competentes.

- Descongelar en hielo las células (One Shot® TOP 10).
- Adicionar 1 μL del producto de ligación, a cada tubo con bacterias.
- Incubar en hielo por 30 min.
- Incubar a baño María a 42 °C, por 50 seg.
- Incubar en hielo 2 min.
- Adicionar 900 μL de medio LB.
- Incubar a 37 °C por 1 hr con agitación suave.
- Sembrar *E. coli* en placas con medio LB Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- Crecer bacterias *E. coli*, a 37 °C por 24 h.
- Seleccionar clones tres colonias. tomar con palillos.
- Sembrar bacterias *E. coli*, en tubos de Ensaye con rosca con medio LB con penicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Crecer bacterias *E. coli*, por 24 h a 37 °C, en agitación suave.
- Se puede almacenar en refrigeración, lejos de la luz.

6.13.2. Elaboración de resguardo de plásmidos.

El resguardo se realizó mezclando:

- 200 μL de glicerol al 100%.
- 800 μL de plásmido celular de bacterias *E. coli*.
- Conservar a -80 °C.

6.13.3. Extracción del ADN plasmídico de las bacterias recombinantes “Mini-prep kit”.

Se elaboró con el kit “Gen Elute Plasmid Mini-Prep Kit” de SIGMA.

- Tomar 3 mL de células.
- Centrifugar a 10,000 rpm un volumen de 1-2 mL.
- Retirar sobrenadante.
- Adicionar solución de resuspensión 200 μL .
- Resuspender la pastilla, mezclar suavemente con pipeta arriba y abajo.
- Adicionar solución de lisis 200 μL .
- Mezclar suavemente, hasta que la solución aclare, por 5 min.



- Neutralizar con Neutralization/Binding Buffer (S3) 350 μ L.
- “No vortex”, mezclar de 4-6 veces el tubo.
- Centrifugar por 10 min a 14,000 revoluciones.
- Preparar tubos columna y adicionar 500 μ L. de solución preparadora de columnas.
- Centrifugar por 1 min y desechar la solución del fondo.
- Extraer la fase clara de las muestras.
- Colocar muestras en columnas ya preparadas.
- Centrifugar por 1 min.
- Tirar fase clara que se precipita en el fondo.
- Remover contaminantes con solución de lavado, adicionar 750 μ L. en el tubo columna y centrifugar por 1 min.
- Retirar tubo columna.
- Purificar ADN plasmídico.
- Adicionar a tubo columna solución de flujo 100 μ L.
- Centrifugar por 1 min.
- Retirar tubo columna.
- ADN listo en sobrenadante.
- Verificar bandas clonadas en gel de agarosa al 2 %.
- Almacenar ADN por debajo -20 °C.

6.13.4. Reamplificación de los ADNc diferenciales.

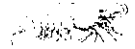
Se preparó la mezcla de la siguiente forma:

- 2 μ L (Oligo P)
- 2 μ L (Oligo T)
- 16 μ L (PCR Mix)
- 10 μ L (ADN Mini-Prep)
- Correr PCR. (Cuadro 5).
- Cuantificar ADN.
- Preparar muestra para enviar a secuenciar.
- El resto de la muestra puede ser guardado a -20 °C, hasta que se requiera nuevamente su uso.



Cuadro 5. Programa para correr PCR de amplificación de Despliegue Diferencial, para (*L. vannamei*).

<i>Nº de Ciclos</i>	<i>Temperatura de amplificación</i>	<i>Tiempo.</i>
1	94 °C (desnaturalización)	4 min.
40	94 °C (desnaturalización) 60 °C (alineamiento) 68 °C (polimerización)	1 min. 1 min. 2 min.
1	68 °C Termina -4 °C	10 min.



7. RESULTADOS.

7.1. Experimento Biológico.

Durante el mantenimiento de los juveniles de *Litopenaeus vannamei*, se observó que las dietas suministradas tuvieron un efecto en la sobrevivencia de los camarones en cada tratamiento de la siguiente manera: las dietas con proteína vegetal (1) y (4) resultaron ser las mejores con 90 % y 92 % de sobrevivencia, respectivamente, mientras que las dietas con proteína animal (2) y (3) fueron las que menor sobrevivencia mostraron (Fig. 2).

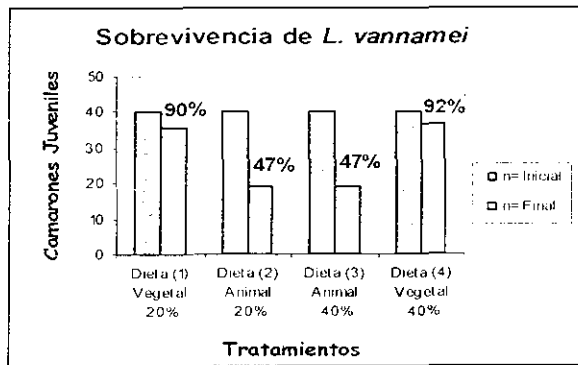


Figura 2 Sobrevivencia de *Litopenaeus vannamei* expuestos a los cuatro tratamientos por 65 días.

El efecto de las dietas en el crecimiento en los camarones se evaluó con el peso de la glándula digestiva (hepatopáncreas): la dieta (3) con 40 % de proteína animal, demostró ser la dieta que aportó una mayor ganancia en peso de los camarones con 186 mg, contra la dieta (4) con 40 % de proteína vegetal, con 139 mg; es decir, una ganancia del 25.2 %, lo que es igual a 47 mg (Fig. 3).

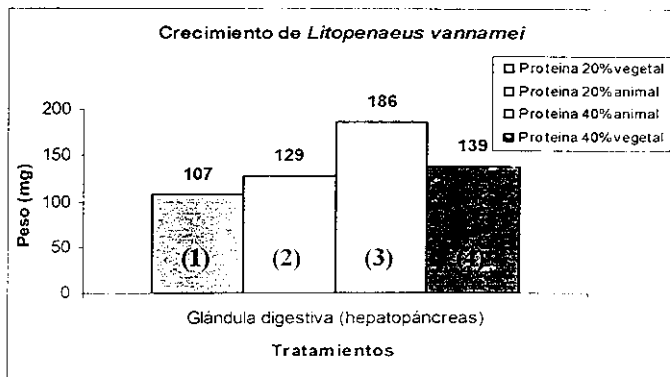


Figura 3 Tasa de crecimiento del camarón blanco *L. vannamei* durante el experimento

*Nota: la evaluación fue con la glándula digestiva=hepatopáncreas que representa el $4 \pm 0.02\%$ (Gaxiola *et al.*, 2005), del peso total de organismo en fresco.

7.2. Análisis Molecular.

Los análisis moleculares se llevaron a cabo para verificar si dentro de las adaptaciones que los camarones presentan bajo las diferentes dietas existen cambios en los patrones de expresión genética. Para ello, se decidió comparar las poblaciones de ARNs mensajeros de poblaciones de camarones expuestos a las diferentes dietas, mediante la técnica del despliegue diferencial de ARN.

En la preparación de los tejidos para aplicar técnicas moleculares, se decide hacer una agregado de hepatopáncreas aislados de camarones sujetos a diferentes tratamientos (Cuadro 6) y aislar el ARN total de cada poza para poder obtener el efecto de cada tratamiento global y evitar un resultado por individuo, lo cual podría resultar en desviaciones estadísticas, así que se pesaron de la siguiente manera:



Cuadro 6. Peso obtenido de un agregado de ocho glándulas digestivas (hepatopáncreas).

Tratamientos	Tipo de Dieta	Genoma acumulado= 8 hepatopáncreas
1	Proteica Vegetal 20 %	107 mg
2	Proteica Animal 20 %	129 mg
3	Proteica Animal 40 %	186 mg
4	Proteica Vegetal 40 %	139 mg

7.3. Extracción de ARN total.

Durante el proceso de extracción del ARN total se emplearon dos métodos:

- El método del fenol ácido de Chomczynsky y Sachi (1987).
- Una adaptación al método anterior, publicada por Valenzuela et al (2005).

ARN con mezcla de Fenol: Isotiocianato de guanidina.

Como puede observarse en la figura 4, mediante la extracción de ARN total con trizol se obtuvieron buenas muestras de ARN, para los tratamientos (1) y (4), con proteína vegetal al 20 % y 40 % respectivamente, mientras que los tratamientos (2) y (3) con dietas con proteína animal 20 % y 40 % respectivamente no se obtuvieron buenos resultados.

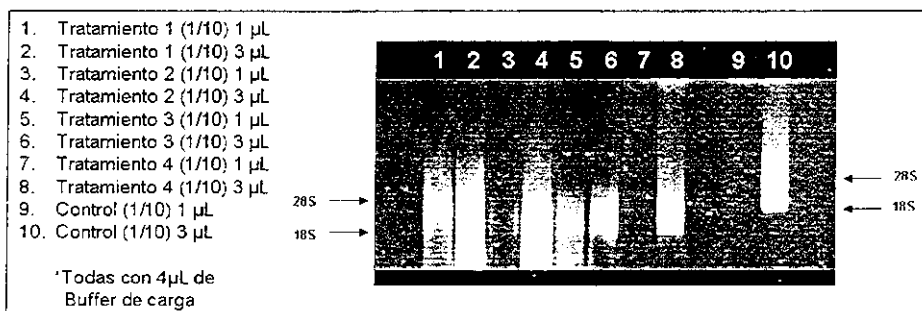


Figura 4 Extracción de ARN total de hepatopáncreas por el método de Chomczynsky y Sachi (1987) en *Litopenaeus vannamei*.



Debido a que los tejidos aislados son fuentes ricas en nucleasas y podrían estar contaminadas con metabolitos propios de la glándula digestiva (hepatopáncreas), decidimos adicionar un paso de extracción orgánica con una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico, lo cual permitiría eliminar proteínas y grasas contaminantes de las muestras de ARN. Los resultados se muestran en la figura 5.

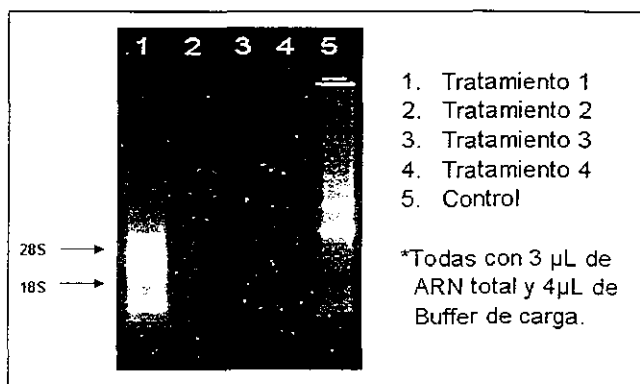


Figura 5 Extracción de ARN total por el método de Chomezinsky y Sachi (1987), para la glándula digestiva (hepatopáncreas) de *Litopenaeus vannamei* extracciones lavadas con cloroformo-isoamílico.

Como puede observarse la extracción del ARN total, por la técnica de cloroformo-isoamílico (Figura 5) el ARN se degradó en tres de los cuatro tratamientos evaluados, [muestras (2), (3), y (4)]. Por lo tanto, se desistió en el uso de esta metodología.

Se buscó en la literatura la existencia de métodos alternativos para extraer ARN de tejidos ricos en grasas y carbohidratos complejos. Uno de estos métodos es el reportado por Valenzuela *et al.* (2005). Este método es una derivación del método de Chomezinsky y Sachi en el que se adicionan un par de pasos destinados a la eliminación de elementos contaminantes mediante lavados con soluciones salinas y precipitación selectiva con cloruro de litio.

7.4. Extracción de ARN mediante el método de Valenzuela *et al.* (2005).

Esta metodología se aplicó inicialmente al tratamiento (4) antes de ser aplicada al resto de las muestras (figura 6).

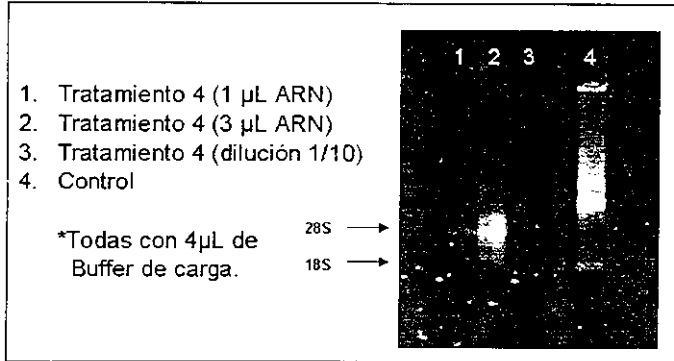


Figura 6 Extracción de ARN total de la glándula digestiva (hepatopáncreas) en *Litopenaeus vannamei*, con una variación en la metodología de Valenzuela, en el tratamiento #4.

Al observar buenos resultados con esta metodología se decidió aplicar al resto de las muestras (Figura 7).

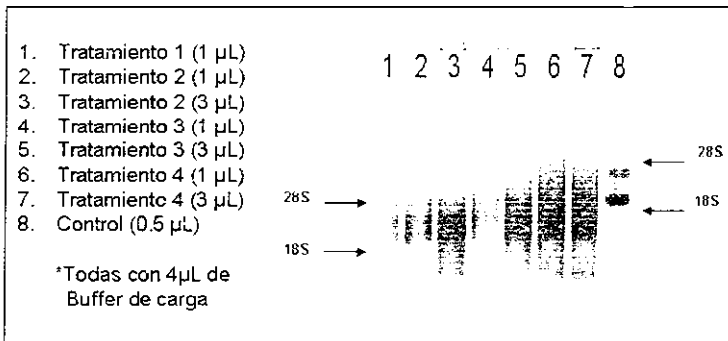


Figura 7. Extracción de ARN total en *Litopenaeus vannamei* por la metodología de Valenzuela para todos tratamientos.

En ambas (Fig. 7), se observó una excelente presencia de las sub-unidades 28S y 18S para cada uno de los tratamientos, con lo que se culmina con una excelente extracción de ARN total mediante esta metodología.



7.5. Cuantificación del ARN total.

El ARN se cuantifica mediante su absorción espectrofotométrica a 260 nm, tomando en cuenta que por relaciones empíricas se ha determinado que 1 unidad de densidad óptica equivale a 40 microgramos de ARN por cada mililitro de solución.

Cuadro 7. Lecturas a 260 nm para evaluar la concentración del ARN total en cada una de los tratamientos.

Tratamientos	Lectura a 230 nm	Lectura a 260 nm	Lectura a 280 nm	Concentración del ARN en la cubeta	Concentración del ARN total (25 µL)
1	0.015	0.040	0.020	1.6 µg/µL	40 µg/µL
2	0.027	0.056	0.028	2.24 µg/µL	56 µg/µL
3	0.036	0.064	0.037	2.56 µg/µL	64 µg/µL
4	0.031	0.067	0.034	2.68 µg/µL	67 µg/µL
5 Control dieta comercial	0.029	0.058	0.031	2.32 µg/µL	58 µg/µL

En (Cuadro 7), se observan las lecturas obtenidas a 260 nm para cada uno de los tratamientos en *L. vannamei*, ya que a esta lectura el ARN toma su mayor excitación.

Con base en lo anterior, las muestras de ARN quedaron listas para su comparación mediante el despliegue diferencial, el cual comprende los siguientes pasos:

- Eliminación de trazas de ADN genómico contaminante.
- Transcripción reversa del ARN a ADN complementario con un cebador oligo-dT.
- Amplificación por PCR de los ADNc de cadena sencilla con cebadores aleatorios.
- Fraccionamiento de los productos de PCR en un gel desnaturalizante de poliacrilamida.
- Aislamiento de los ADNc diferenciales y su reamplificación en una nueva PCR con los mismos cebadores originales.
- Clonación en vectores plasmídicos de los fragmentos de ADNc reamplificados.
- Secuenciación de los insertos de ADNc.
- Corroboración de la expresión diferencial para cada uno de los ADNc diferenciales detectados originalmente en el gel de poliacrilamida.



Eliminación de ADN contaminante de las muestras de ARN total.

Debido a que la comparación de las poblaciones de ARN total de cada tratamiento implica la amplificación exponencial mediante la técnica de PCR, es imprescindible eliminar cualquier traza de ADN para evitar resultados falsos positivos. Esto se logra mediante el tratamiento de las muestras de ARN con la enzima *DNasa I*, que elimina selectivamente al ADN sin alterar la integridad del ARN. En este trabajo se utilizó un protocolo comercial de la casa Ambion (*DNA-free[®]*). A continuación se presenta el resultado del tratamiento de *DNasa*.

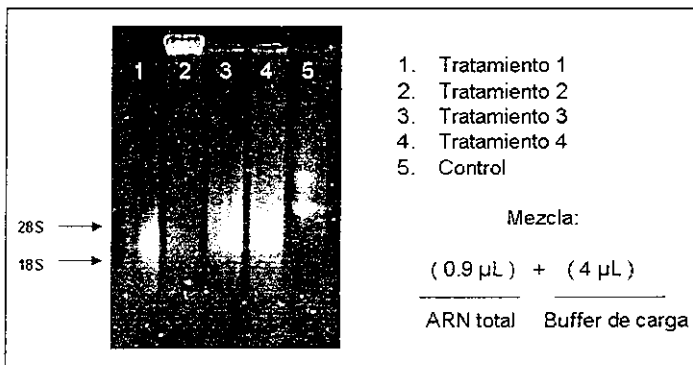


Figura 8 Comprobando la integridad del ARN total tratado con *DNA-free* en *Litopenaeus vannamei*.

En la figura 8 se observa que existe una buena presencia del ARN ya tratado con la *DNasa*, para cada uno de los tratamientos. Puede observarse la ausencia de *DNA* y que las muestras de ARN total conservan su integridad

7.6. Síntesis de la primera cadena de ADN complementario.

El primer paso en el análisis del despliegue diferencial es la conversión de cada molécula de ARN a su ADN complementario, mediante la acción de una transcriptasa reversa.

Para comprobar si se consiguió la transcripción de las muestras de ARN a su ADN complementario, los productos de la reacción fueron fraccionados en gels de agarosa antes de proseguir con su análisis en gels de secuenciación. Los resultados se muestran en las figuras 9 y 10.

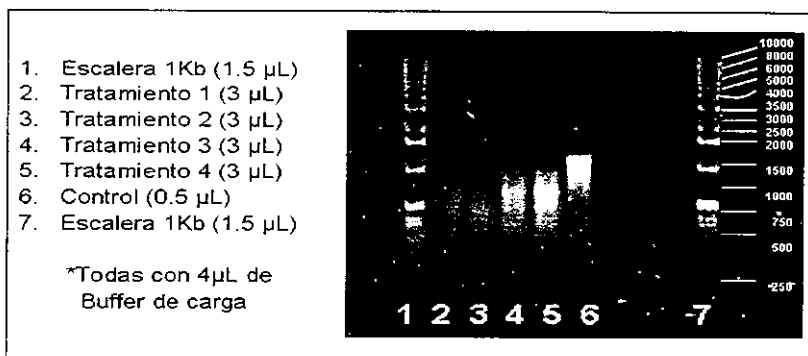


Figura 9 Comprobación de la cADN en muestras de la glándula digestiva (hepatopáncreas) de *Litopenaeus vannamei*.

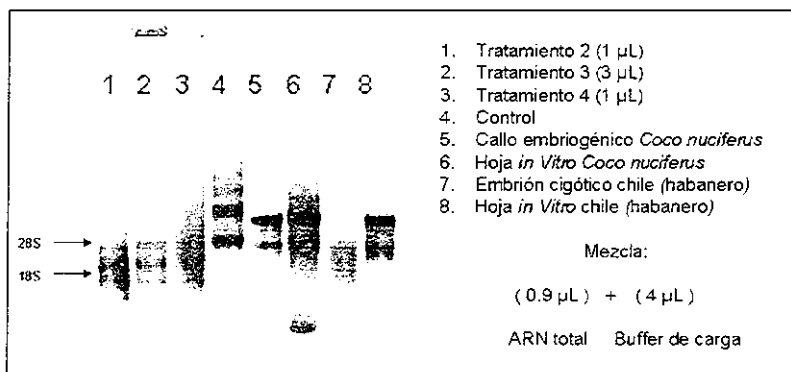
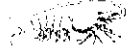


Figura 10. Comprobación de la integridad de ARN total de *Litopenaeus vannamei* contra otras muestras.

En los carriles 2 a 6 de la figura 9 y en los carriles 1 a 3 de la figura 10 se observa muy claramente la presencia del ADN complementario en cada carril, para cada uno de los tratamientos, utilizando marcador de 100 pb como referencia.

Como puede comprobarse, si existe una síntesis adecuada de ADN complementario, por lo que después de esta corroboración se decidió realizar el fraccionamiento en los gels de secuenciación, lo que permite una separación de moléculas de ADN con diferencias en tamaños aún de una sola base.

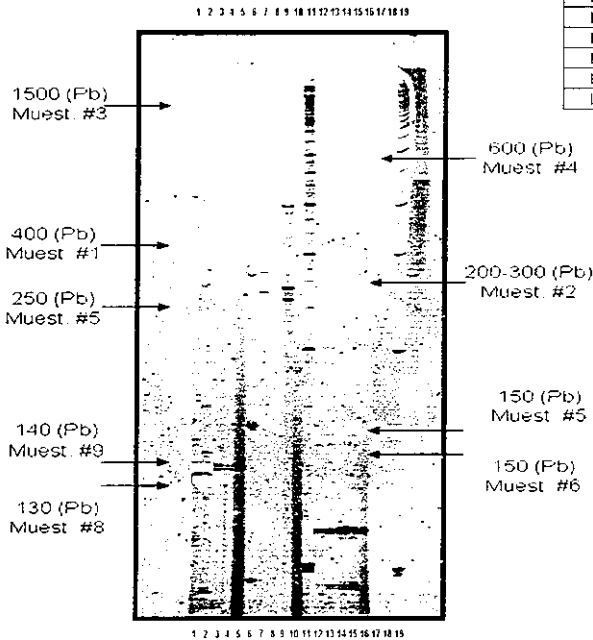


7.7. Despliegue Diferencial.

Cuadro 8. Despliegue Diferencial de *Litopenaeus vannamei*.

Se cargaron las muestras correspondientes a la dieta # 3 (40% proteína animal) y la dieta control, al momento de correr el fraccionamiento electroforético por Despliegue diferencial, de acuerdo con el orden del cuadro 8.

Poza	Carga utilizada
1	Tratamiento dieta # 3 con cebadores P9T6
2	Tratamiento dieta # 3 con cebadores P9T6
3	ARN dieta control con cebadores P9T6
4	ARN dieta control con cebadores P9T6
5	ARN dieta control
6	Tratamiento dieta # 3 con cebadores P9T7
7	Tratamiento dieta # 3 con cebadores P9T7
8	ARN dieta control con cebadores P9T7
9	ARN dieta control con cebadores P9T7
10	ARN dieta control
11	Escala 100Pb
12	Tratamiento dieta # 3 con cebadores PIT1
13	Tratamiento dieta # 3 con cebadores PIT1
14	ARN dieta control con cebadores PIT1
15	ARN dieta control con cebadores PIT1
16	Mezcla de agua con P9T6
17	Mezcla de agua con P9T7
18	Mezcla de agua con PIT1
19	Escala 100Pb



Se aplicó la prueba del Despliegue Diferencial para comparar la expresión génica en camarones expuestos al tratamiento #3 vs dieta control #5, arrojando nueve bandas diferenciales (Figura 11). Las bandas diferenciales fueron cortadas del gel y se extrajo el ADN, se reamplificó por PCR (Figura 12) y se ligó (Figura.13).

Figura 11 Aplicación de la técnica del Despliegue Diferencial, en *Litopenaeus vannamei* para evaluar el efecto de la dieta.

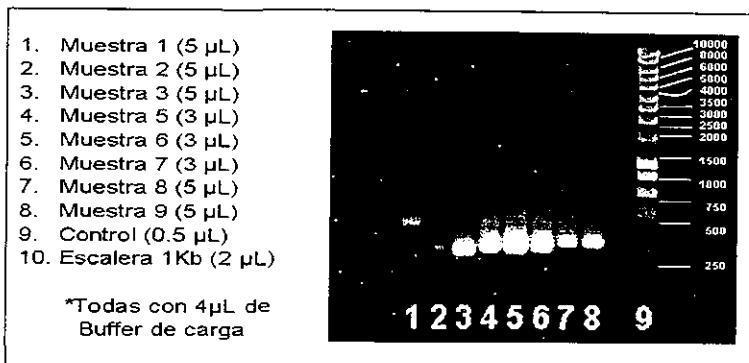


Figura 12. Reamplificación por PCR a partir de los productos diferenciales en *Litopenaeus vannamei*, para tratamiento #3 contra control #5.

Las bandas reamplificadas se ligaron en un plásmido y con los plásmido recombinantes obtenidos se transformo la cepa DH5 α de *E. coli*. En la figura 13 se observa el análisis de la clonación del fragmento #4 mediante amplificación por PCR empleando como molde el plásmido recombinante. Puede observarse en el carril 5 que el tamaño del inserto en el plásmido es igual al de la banda reamplificada que se aisló del gel de poliácridamida, por lo que se concluye que sí se pudo clonar.

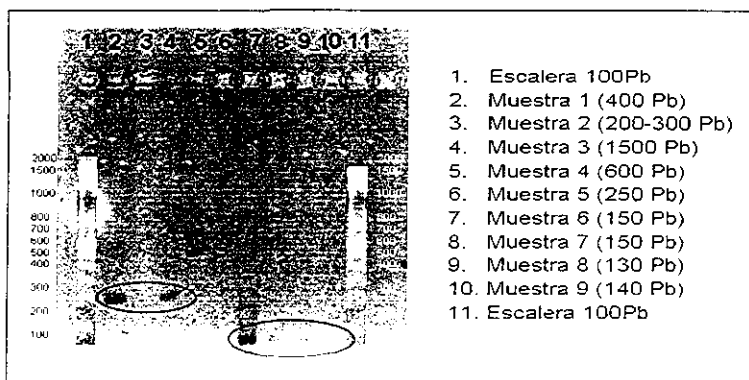


Figura 13 Reamplificación de bandas diferenciales en *Litopenaeus vannamei*, del tratamiento #3.

De la misma manera se analizaron las otras bandas reamplificadas, lo que se muestra en la figura 14. Los carriles del gel corresponden al siguiente orden numerado: muestras 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9, respectivamente.

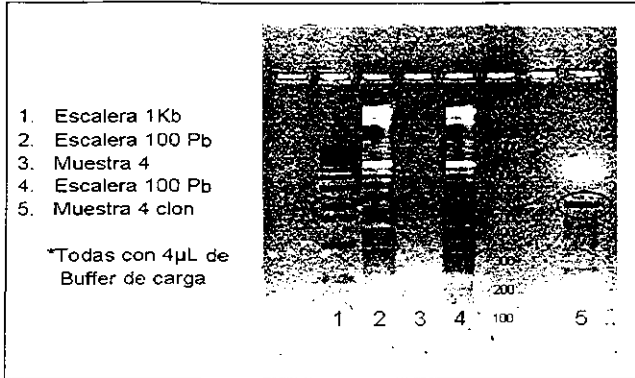


Figura 14 Clona contra muestra #4 de *Litopenaeus vannamei*.

7.8. Clonación de los fragmentos diferenciales.

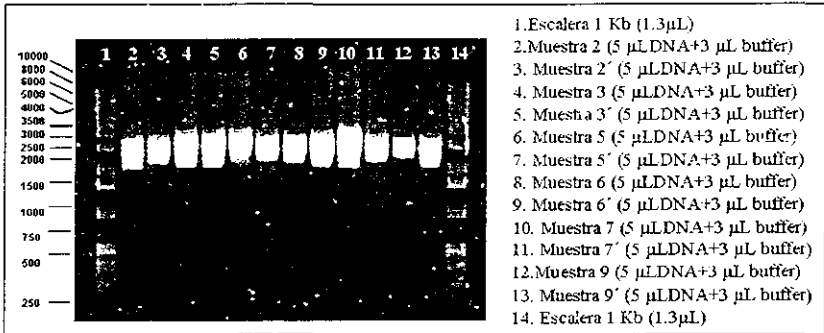


Figura 15 Productos de mini preparación plasmídica de clones de *Litopenaeus vannamei*, por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con 1 μ g/mL de bromuro de etidio.

Después de ver que el plásmido de la bacteria estuvo presente en todos los productos de la mini preparación (Figura 15), éste fue linearizado para determinar la presencia de insertos en cada uno de ellos, mediante su corte con las siguientes enzimas de restricción.

- *Eco* RI
- Mezcla de *Apa* I y *Pst* I
- *Nor* I



7.9. Análisis de restricción de diferentes plásmidos recombinantes.

Corte con la enzima *Eco* RI.

Debido a que en el plásmido pGEM-T-Easy, específico para la clonación de productos de PCR mediante la estrategia TA se encuentra un sitio de la enzima *Eco* RI en cada extremo flanqueante del sitio múltiple de clonación, bastaría un solo corte con esta enzima para liberar el inserto. Con esta enzima se trabajaron las muestras bajo las siguientes condiciones: 37 °C por 1 h.

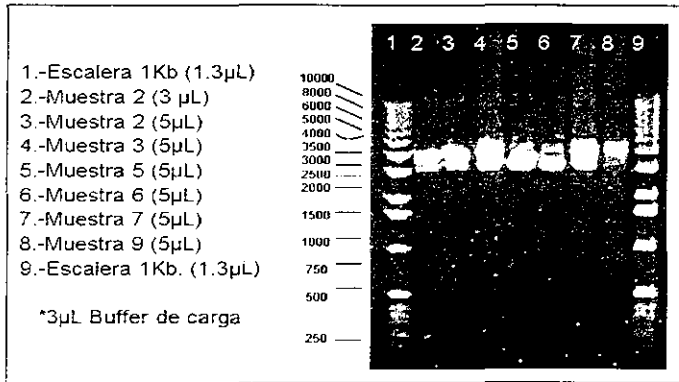


Figura 16. Restricción de muestras con enzima *Eco* RI, para todos los clones de *Litopenaeus vannamei*.

Como puede observarse, para ninguna de las clones pudo obtenerse el fragmento clonado, pero es probable que solamente se haya linearizado el plásmido. La razón podría deberse a la pérdida de uno de los dos sitios *Eco* RI, algo que se ha detectado en el laboratorio. Por esa razón, se determinó intentar la extracción de los insertos con otras enzimas de restricción presentes en el sitio múltiple de clonación, decidimos emplear *Not* I y también la mezcla de *Apa* I y *Pst* I.

7.10. Corte con la mezcla de enzimas *Apa* I y *Pst* I.

Ambas enzimas tienen un solo sitio de restricción bordeando al inserto. Se incubó por 1 h a 37 °C.

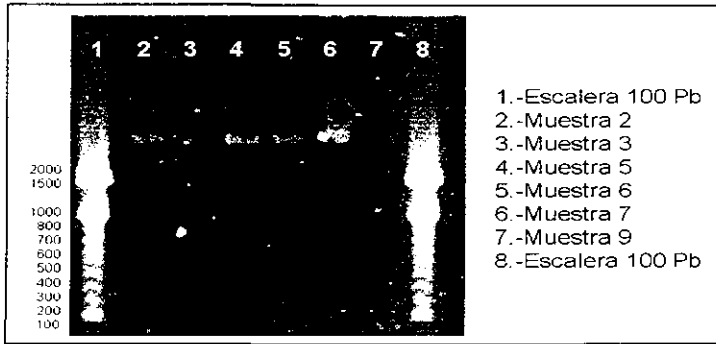
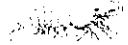


Figura 17 Restricción de muestras con enzima *Apa I Pst I*, para todos los clones de *Litopenaeus vannamei*.

7.11. Corte con la enzima *Not I*.

Con esta enzima *Not I* se trabajó a 37 °C por 1h.

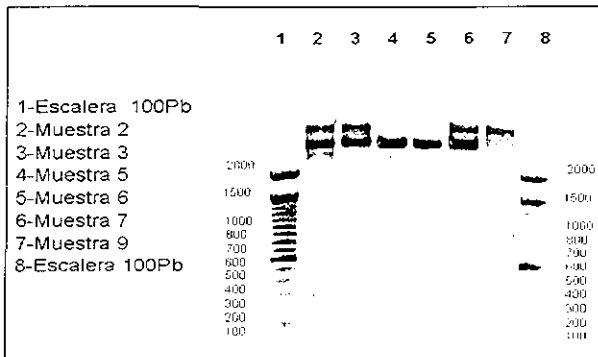


Figura 18 Restricción de muestras con enzima *Not I*, para todos los clones de *Litopenaeus vannamei*.

Una vez que se emplearon distintas enzimas de restricción y al ver que únicamente se liberó un fragmento de la clona mostrada en el carril 4 se decidió amplificarlos mediante PCR. Los resultados muestran que en ninguna de las clonas puede amplificarse el inserto de interés, como puede observarse en la figura 19. Para cada clona se amplificó el correspondiente ADN original extraído del gel, como testigo positivo

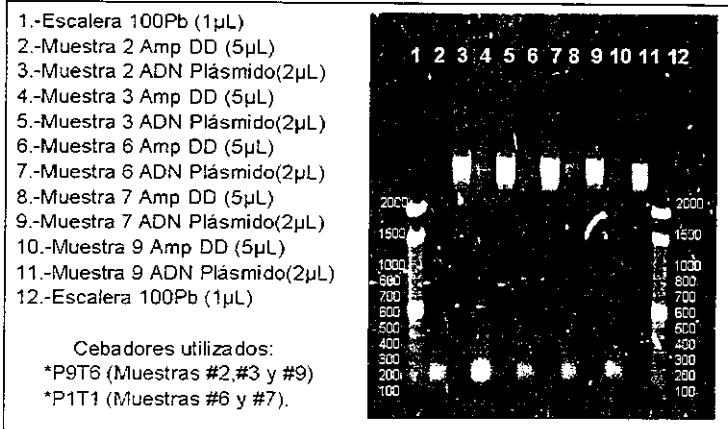
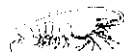


Figura 19 Comparación de muestras, contra muestras de PCR amplificadas y ADN clon de *Litopenaeus vannamei*.

De esta manera, es probable que para cada una de las nuevas muestras se haya perdido el ADN, por lo que el ensayo concluyó con la amplificación del fragmento #4 descrito anteriormente.



8. DISCUSIÓN.

8.1. Experimento Biológico.

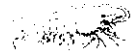
La sobrevivencia de los camarones en este estudio, con el uso de la dieta a base proteica vegetal, demostró ser alta y se vio determinada por los hábitos alimenticios, de acuerdo con los estudios realizados en peneidos por Mc Tighe y Zimmerman (1991), indican que son omnívoros y que algunas especies presentan tendencias carnívoras o herbívoras. Esto es muy importante, pues la tendencia actual es probar dietas con proteína vegetal como fuente alternativa, la cual minimiza costos de producción y disminuye el afluente de contaminantes. Sin embargo, por un lado estudios como el presente trabajo son pioneros y establecen las bases para continuar con esta línea de investigación, y por otro lado el siguiente paso es analizar la calidad del tejido en los organismos nutridos bajo este régimen alimenticio.

Se ha observado en general, que las especies del subgénero *Farfantepenaeus* (*F. duorarum*, *F. aztecus*, *F. brasiliensis*) presentan hábitos omnívoro-carnívoros, mientras que las especies del subgénero *Litopenaeus* (*L. setiferus*, *L. vannamei*, *L. schmitti*) tienen hábitos omnívoro-herbívoros (Marte 1980; Hunter y Feller, 1987).

El crecimiento de los camarones se evidenció mediante el uso de la dieta a base proteica animal. Mc Tighe y Zimmerman (1991) afirman que estas preferencias están asociadas con los distintos suministros de materia de origen animal o vegetal en la dieta. Aún que recientemente se ha observado diferencias en los hábitos alimenticios y en los requerimientos nutricionales que están asociadas también con la capacidad de las especies para utilizar en diferentes proporciones a las proteínas como sustrato metabólico (Rosas *et al.*, 1995).

8.2. Análisis Molecular.

Siguiendo el protocolo descrito por Chomczynski and Sacchi (1987), basado en la desnaturalización y en la separación de proteínas mediante una mezcla de Fenol: Isotiocianato de Guanidina, no se pudo extraer el ARN total.



Para la obtención de muestras intactas de ARN de alta calidad, el paso más crítico en los experimentos de biología molecular (Zúñiga y Godoy, 2005). La extracción del ARN total mediante isopropanol y una mezcla de citrato de sodio (0.8M), con cloruro de sodio (1M), fue bastante bueno, mediante una variación en la técnica descrita por Valenzuela *et al.*, (2005). De acuerdo con Romf and Kahl (1997) y Romero y Estrada (2005), se comprobó la integridad del ARN en geles de agarosa, observándose una buena calidad con la presencia de las sub unidades 18s y 28s (Zúñiga y Godoy, 2005).

La cuantificación del ARN es similar a la reportada para los decápodos (Otta and Landry, 1984; Anger and Hirche, 1990; Lemmens, 1995) y en *L. schmitti* por Lemos *et al.*, (2002), medido por espectrofotometría de acuerdo con Sambrook *et al.*, (1989).

Se efectuó la síntesis de primera cadena mediante oligo-dT, como lo menciona Liang *et al.*, (1993) y siguiendo las recomendaciones de Ikononov and Jacon (1996), para obtener un ARN en buenas condiciones para ser analizado por mediante la técnica de Despliegue Diferencial, ya que en geles de agarosa es difícil confirmar la retrotranscripción del ARN (Colonna-Romano *et al.*, 1998).

8.3. Despliegue Diferencial

Desde la invención de la técnica de Despliegue Diferencial por Liang y Pardee (1992), esta técnica se ha utilizado para analizar el ARN, son suficientes (0.2 µg) de ARN total para el uso de esta técnica como lo describe Liang *et al.*, (1993).

La identificación de genes que se expresan diferencialmente es posible gracias a esta técnica tal y como lo mencionan (Liang *et al.*, 1993; Ikononov and Jacob, 1996; Graf *et al.*, 1997; Spencer and Christensen, 1999; Pienta and Schwab, 2000; Chen *et al.*, 2001; Aittokallio *et al.*, 2003). Se detectaron nueve bandas diferenciales de ADNc (Fig. 11), estos resultados obtenidos son similares a los que describe Huvet *et al.*, (2003) mediante la identificación de dos genes de α -amilasa en *Crassostrea gigas*, comparándose el RNA extraído de una glándula digestiva por efecto de dos diferentes raciones de alimentación.

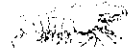
De los productos obtenidos del despliegue diferencial, se logró la clonación de una banda de aproximadamente 2000 pares de bases, mediante las recomendaciones dadas por



Sambrook *et al.*, (1989) (Fig. 14); sin embargo la secuencia demostró que esta clona no tiene similitud con ninguna reportada en la literatura. Es importante señalar que no se logró la clonación de las demás bandas diferenciales a pesar de haber logrado su reamplificación, por lo que no se pudieron conocer sus secuencias.

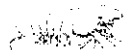
A pesar de que se detectó la expresión diferencial y que la secuencia de al menos un gen no presentó similitud con bases de datos este trabajo aporta un gran avance al lograr la estandarización de la técnica, tal y como ocurrió en estudios en vegetales (Tesis de Doctorado de Gabriel Lizama para *Cocos nucifer*.). Además en Medline existen 1810 publicaciones registradas hasta el año 1999, de las cuales 1215 publicaciones incluyen la técnica de expresión diferencial; es decir el 67 % de las publicaciones recientes analizan la expresión génica.

Finalmente, este trabajo representa un avance para los estudios en crustáceos, deja abierta una enorme serie de preguntas por contestar al dejar abierta una línea de investigación novedosa, que vincula la nutrición, la genética poblacional y las herramientas moleculares, en un campo tan importante como lo es la camaronicultura y por otro lado queda estandarizada la técnica para la extracción de ARN en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.



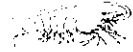
9. CONCLUSIÓN.

- Durante el experimento biológico con *Litopenaeus vannamei*, el tratamiento # 4 (dieta con el 40 % de proteína vegetal) arrojó la mayor sobrevivencia con respecto al resto de los tratamiento mientras que el tratamiento # 3, proporcionó el mayor crecimiento mediante el uso de 40 % de proteína animal en su dieta, durante su alimentación.
- El emplear isopropanol y una mezcla de citrato de sodio con cloruro de sodio para extraer y conocer el ARN total del camarón blanco (*L. vannamei*), favoreció la estandarización de la técnica
- La técnica del Despliegue Diferencial, es una excelente herramienta para buscar la expresión de genes, mediante el uso de algunos nanógramos de ARN, aún cuando no se conozca la secuencia de algún gen en específico. He incluso para monitorear el encendido, apagado o sobre expresión de los mismos genes estimulados por agentes externos.
- Se observaron cambios en el ARNm de *Litopenaeus vannamei* mediante la técnica del (DDRT-PCR), aunque no se logró comparar el ARNm, con el resto de los tratamientos.
- La aplicación de técnicas moleculares como el Despliegue Diferencial en geles de poliácrilamida teñidos con bromuro de plata constituyen el primer trabajo para el estudio del efecto regulador de la dieta en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.
- Se demostró que la técnica del Despliegue Diferencial (DDRT-PCR) con las adaptaciones realizadas, es eficiente para seleccionar ADNc diferenciales de individuos sometidos a una dieta durante su alimentación y finalmente quedó estandarizada la extracción del ARN total en *Litopenaeus vannamei* y abre una gran serie de preguntas por resolver en esta línea de investigación



10. REFERENCIAS

- Aiittokallio, T., Pahikkala, T., Ojala, P., Nevalainen, T. J. and Nevelainen O. 2003. Electrophoretic Signal Comparison Applied to mRNA Differential Display Analysis. *Biotechniques* 34: 116-122.
- Akiyama, D. M., Dominy, W. G., Lawrence, A. L., 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: Fast, A. W. and Lester, L. J. Edits. *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier, Amsterdam. Vol 23. Pp. 535-568.
- Al-Mohanna, S. Y., Nott, J.A., Lane, D. J. W. 1985a. M-'midget' cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Haan, 1844). *Decapoda, Natantia, Crustaceana*. 48: 260–268.
- Anger, K., and Hirche, H. J. 1990. Nucleic acids and growth of larval and early juvenile spider crab, *Hyas araneus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 105: 403-411.
- Bohni, R., Riesgo-Escobar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andruss, B. F., Beckingham, K., and Hafen, E., 1999. Autonomus Control of Cell and Organ Size by CHICO, Drosophila homolog of Vertebrate IRS1-4. *Cell* 97, 865-875.
- Bonilla E., Párraga M., López L. A., Escolar F. y Del Marzo J. 2002. Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real. *Artículos Científicos en Genética* 27(1)3-7.
- Browdy, C. L., 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production Technologies: improving the outlook for superior captive stocks. *Aquaculture*. 64, 3-21.



- Carrillo, O., Vega-Villasante, F., Nolasco, H., y Gallardo N. 2000. Aditivos alimentarios como estimuladores del crecimiento de camarón. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22- Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán., México.
- Ceccaldi, H. J., 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En Crustacean Nutrition. In: Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, Vol. 6, pp. 261-291.
- Chen, Z. J., Shen, H., and Tew, K. D. 2001. Gene expression profiling using a novel method: amplified differential gene expression (ADGE). Nucleic Acids Research. 29: 1-7.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemichemistry* 162: 156-159.
- Chu, K. H., Ovsianico-Koulikowsky, N. N., 1994. Ontogenetic changes in metabolic activity and biochemical composition in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. Journal Marine, Biology and Ecology. 183: 11-26.
- Colonna-Romano, S.; Leone, A. & Maresca. B. Differential display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. 1998. 124p.
- Conlon, I., and Raff, M., 1999. Size control in animal development. Cell 96, 235-244.
- Creator™. SMART™. 27 March 2001. "*cDNA Library construction Kit User Manual*", Protocolo # PT3577-1, (Versión # PR12792). Catálogo (K1053-1) CLONTECH.



- Cruz-Suárez, L. E., Guillaume, J., 1987. Squid protein effect on growth of four penaeid shrimp. *J. of the World Aquaculture society*, 18, 209.
- De las Cagigas-Reig A., Ferreira, C. R., y Tam, H. M. A., 2002. *Biología Molecular Y Nutrición*. Revista Cubana Alimentación y Nutrición 16(1):69-76.
- De Risi J. L., Liver V. R., and Brown P. 1997. Exploring the metabolic and control of gene expression on a genomic scale *Science* 278:680-686.
- DNA-free™. "Dnase Treatment y Removal Reagents". Catalogo # 1906, version (0102:1-3). Ambion®, The RNA Compay™.
- Dore, I. y Frimodt, C. 1987. *An illustrated guide to shrimp of the world*. Osprey books. Huntington, Ny, USA. 229pp.
- Ezquerro-Brauer, J. M., Salazar-Leyva, J. A., Bringas-Alvarado, L., and Rouzaud, O. 2003. Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *European Food Research and Technology*. 4: 277-280.
- Fox, C., Brown J., and Briggs, M., 1995. The nutrition of prawns and shrimp in Aquaculture-a review of recent research. *Recent Avances in Aquaculture V*, 131-206.
- Frøystad, M. K., Lilleng, E., Vekterud, K., Valen, E. C. and Krogdahl, A. 2006. "Comparison of intestinal gene expression from atlantic cod fed standar fishmeal and soybean meal, by means of suppression subtractive hybridization" in xii international symposium fish nutrition & feeding. Biarritz, france June 1, 2006.



- Galindo, J., Fraga, I., De Arazoza, M., Fajer, E., González, R., y Forrellat, A., 2001. Evaluación de diferentes niveles de proteína en el crecimiento de juveniles de camarón rosado *Penaeus notialis*. Revista de Investigaciones Marinas. 1: 39-44.
- Gamboa D. J. 2001. "Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia.", tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias 12-62pp.
- García, T. 1996. *Avances en el conocimiento de la nutrición de camarones penidos*. Taller La investigación científica en penidos de Iberoamérica. CYTED, CENAIM, Ecuador. 15 pp.
- Gaxiola, G., Cuzon, G., García, T., Taboada, G., Brito, R., Chimal M. E., Paredes, A., Soto, L., Rosas, C., van Wormhoudt, A. 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comparative biochemistry and Physiology, Part A* (140) 29-39.
- Gibson, R., and Barker, P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17: 285-346
- Graf, D., Fisher, A. G., and Markenschlager, M., 1997. Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Research*. 11: 2239-2240.
- Gross, P. S., Bratlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W., and Warr, G. W. 2001. Immune gene discovery by expressed sequence White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic Whit Shrimp, *L. setiferus*. *Developmental y Comparative Immunology*. 25: 565-577.



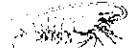
- Guillaume, J., Ceccaldi, J., 2001 Digestive physiology of shrimps. En Nutrition and feeding of fish and crustaceans. Pp. 239-263.
- Hirsch, G.C., Jacobs, W., 1928. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. I. Teil: Methodik und Technik. Der Beweis der Periodizität. Zeitschrift für vergleichende Physiologie. 8: 102-144.
- Huberman, A., 1990. Hormonal control of molting in crustaceans. Programme Clinic Biology Research. 342: 205-210.
- Hunter, J. y Feller R. F. 1987. Immunological dietary analysis of two penaeid shrimp species from South Carolina tidal creek. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 107, 61-70.
- Huvet, A., Daniel, J. Y., Quéré, C., Dubois, S., Prudence, M., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Samain, J. F., and Moal, J. 2003. Tissue expression of two α -amylase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. Aquaculture. 4: 1-13.
- Ikononov, O. C., and Jacob, M. H. 1996. Differential Display Protocol With Selected Primers That Preferentially Isolates mRNAs of Moderate- to Low-Abundance in a Microscopic System. *Biotechniques* 20:1030-1042.
- Jacobs, W. 1928. Untersuchungen über die Cytologie der Sekretbildung in der Mitteldarm-drüse von *Astacus leptodactylus*. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. 8: 1-62.
- Kozian, D. H., and Kirschbaum, B. J., 1999. Comparative gene-expression analysis. *Biotechnology*, 2: 73-78.



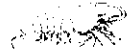
- Laubier-Bornichon, A., Van Wormhoudtm A., Sellos, D., 1977. Croissance larvaire contrôlée de *Peneus japonicus* Bate : enzymes digestives et changements de regimes alimentaires. Publs. Cent. Natn. Exploit Océans (CNEXO) Sér. Act. Colloques 4 :131-145.
- Lehnert, S. A., and Johnson, S. E. 2002. Expression of hemocyanin and digestive enzyme messenger RNAs in the hepatopancreas of the Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B (133) 167-171.
- Lemmens, J. W. T. J. 1995. Nucleic acid levels, cellular activity and growth during the puerulus stage of the western rock lobster *Panulirus cygnus* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 194: 143-156.
- Lemos, D., Ezquerra, J. M., García, C. F. L., 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. Aquaculture Research 186: 89-105.
- Lemos, D., García, C. F. L., Hernández, P., Navarrete del Toro, a. 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. Aquaculture 214: 363-380.
- Lemos, D., Hernández-Cortés, M. P., Navarrete, A., García-Carreño, F. L., Phan, V. N., 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and postlarvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). Marine Biology 135: 653-662.
- Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D. y Van Wormhoudt, A. 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and alpha-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 208, 107-125.



- Liang, P., Averboukh L., and Pardee A. B. 1993. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Research*. 14: 3269-3275.
- Liang, P., and Pardee, A. B., 1992. Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Lovett, D. L., and Felder, D. L., 1990. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Marine Biology* 178: 144-159.
- Lu, Y., Wanh, S. Y., and Lotz, J. M. 2004. The use of differential display to isolate viral genomic sequence for rapids development of PCR-Based detection methods A test case using Taura syndrome virus. *Journal of Virological Methods*. 121:107-114.
- Marte, C. L. 1980. The food and feeding habit of *Penaeus monodon* Fabricius collected from Makato river, Aklan, Philippines (Decapoda, Natantia). *Crustaceana* 3: 225-236.
- Matz, M. V., and Lukyanov, S. A. 1998. Different strategies of differential display: areas application. *Nucleic Acids Research*. 26: 5537-5543.
- Mc Tigue, T. A. y Zimmerman R. J. 1991. Carnivory vs. herbivory in juvenile *Penaeus setiferus* (Linnaeus) and *Penaeus aztecus* (Ives). En: García, T., Gaxiola, G., García, T., Pedroza, R., Soto, S., López, N y Rosas, C. 1998. Influencia de las proteínas dietéticas sobre el crecimiento, la sobrevivencia y el rendimiento de las postlarvas de camarón blanco (*Penaeus setiferus*) y del camarón rosado (*P. duorarum*) del golfo de México. *Revista Aquatic* 2: 22-29.



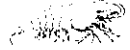
- Molina-Poveda, C., and Civera, R., 1998. Disminución de la proteína en el alimento del camarón como una estrategia para reducir el impacto ambiental. In IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola vol. 2 (Eds. Roberto Civera Cerecedo, Claudia J. Pérez Estrada, L. Denis Ricque Marie y L. Elizabeth Cruz Suárez). La Paz B. C. S. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste.
- Moos, S. M., Divakaran, S., Kim, B. G., 2001 Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquaculture Research. 32: 125-131.
- Otta, A., and Landry, M. R. 1984. Nucleic acids as growth rate indicators for early developmental stages of *Calanus pacificus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 80: 147-160.
- Paoloni-Giacobino, A., Grimbale, R., and Pichard, C., 2003. Genetics and Nutrition. Clinical Nutrition 5: 429-435.
- Pedrazzoli, A., Molina C., Montoya N., Townsend S., León-Hing A., Paredes Y., and Calderón J. 1998. Recent advances on nutrition research of *Penaeus vannamei* in Ecuador. Reviews in Fisheries Science. 61:143-151.
- Perez-Farfante, I. y Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnoses for the Families and Genera. Memories du Museum National D'Historie Naturelle, Paris, France. 233 pp.
- Pienta, K. J. and Schwab. 2000. Modified Differential Display Technique that Eliminates Radioactivity and Decreases Screening Time. *Biotechniques* 28: 272-277.
- Pillay, T. V. R. 1997. Acuicultura. Principios y Prácticas. Editorial Limusa México, D. F. 697 pp.



- Ricque-Marie, D., Abdo-de La Parra M. I., Cruz Suárez E., Chuzón G., Cousin M., Aquacop, Pike I.H. 1998. Raw material freshness, a quality criterion for fish meal fed to shrimp. *Aquaculture Research* 165: 85-109.
- Roman Jung, Cornelia Lübecke, Christoph Wagener and Michael Neumaier. 1997. mRNA Differential Display in Agarose Gels. *Biotechniques* 23: 28-32.
- Romero C. Mariela y Rolando Estrada-Jiménez. 2005. Selección de fragmentos diferenciales de ADNc relacionados con estrés hídrico en *ullucus tuberosus loz.* (Bassellaceae) <<olluco>>. *Revista Biología de Perú*. 1:135-140.
- Rompf. R. and Kahl G 1997. mRNA Differential Display in Agarose Gel. *Biotechniques*. 23: 28-32.
- Rosas, C., Sánchez, A., Díaz, E., Soto, L. A., Gaxiola, G., Brito, R., Baez, M. y Pedroza, M. 1995. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae fed purified test diets: effect of protein level on substrate metabolism. *Aquatic Living Resources* 18, 161-169.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M. and Van Wormhoudt, A. 2000. El Metabolismo de los Carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V*. Pp 1-20.
- Rosenberry, R. 1996. *World Shrimp Farming 1996*. Shrimp News International San Diego, CA, USA. 284 pp.
- Rosenberry, R. 1998. *World Shrimp Farming 1998*. Shrimp News International San Diego, CA, USA. 328 pp.



- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sánchez, P. A., García, C. F., Muhlia, A. A., Hernández, N. Y. S., and Yepiz, G. P. 2003. Differential expression of trypsin mRNA in the white shrimp (*Penaeus vannamei*) midgut gland under starvation conditions. *Journal of Experimental Marine and Ecology*. 292: 1-17.
- Sarac, H., Gravel, M., Saunders, J., and Tabret, S., 1993. Evaluation of Australian protein sources for diets of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) by proximate analysis and essential amino acid index. From discovery to commercialization., European Aquaculture Soc., Oostende (Belgium), p. 167, Special Publication, European Aquaculture Society, no 19.
- Schwamborn, R. y Criales, M. M. 2000. feeding strategy and daily ration of juvenile pink shrimp (*farfatepenaeus duorarum*) in a South Florida sea grass bed. *Marine Biology* 137, 139-147.
- Sequi-Gen®. "GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell". Instruction Manual (165-3860, 61, 62, and 63). BIO-RAD.
- Smith, D.M., and Dall, W., 1985. Moulting-staging the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. In: Rothlisberg, P.C.; Jill, B.J.; Staples, D.J. (eds). Second Australian National Prawn Seminar Proc. NPS 2: 85-93.
- Spencer, W. E. and Christensen, M. J. 1999. Multiplex Relative RT-PCR Method for Verification of Differential Gene Expression. *Biotechniques* 27: 1044-1052.
- Sudaryono, A., Hoxey, M.J., Kailis, S.G., Evans, L.H., 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 134: 313-323.



- Tacon, A. G. J., 1990. Standar Methods for the Nutritional and Feeding of Farmed Fish and Shrimp. *The Essential Nutrients (I)*. Argent Laboratories Press. Washington. USA.
- Tacon, A. G. J., and Akiyama, D. M., 1997. Feed ingredients. In: D`Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition*. Advances in World Aquaculture, vol. 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 411-472.
- TOPO TA Cloning®. 8 April 2004. "Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products". Version R (25-0184), INVITROGEN.
- Torstensen, B. E., Jordal, A-E. and Lie, O. 2006. "Liver lipid, plasma lipoproteins and expression of fatty acid binding proteins (fabp's) in atlantic salmon (*salmon salar L*)- effects of complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend" in xii international symposium fish nutrition & feeding. Biarritz, France June 1, 2006.
- Valenzuela A. J. P., Estrada-Mota, I. A., Lizama-Uc. G., Souza-Perera. R., Valenzuela-Soto, E. M., and Zúñiga-Aguilar J. J., 2005. Use of Simple Method to Isolate Intact RNA From Partially Hydrated *Selaginella lepidophylla* Planst. Plant Molecular Biology Reporter 23:199-200 June 2005.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. 1995. Serial Analysis of Gene Expression. Science 270: 484-487.
- Vieites J. M., Sánchez P. A., Gil, A., and Suárez, A., 2005. "Desarrollo de un protocolo de análisis de la expresión génica mediante Differential Display, que reduce el numero de falsos positivos". *Ars Pharm* 46(2): 193-204.



- Vogt, G., Stöcker, W., Storch, V., Zwilling, R., 1989. Biosynthesis of Astacus protease, a digestive enzyme from crayfish. *Histochemistry* 91,373-381.
- Wang, A., Pierce, A., Judson-Kremer, K., Gaddis, S., Aldaz, C. M., Johnson, D. G., and MacLeod, M. C., 1999. Rapid Analysis of gene expression (RAGE) facilitates universal expression profiling, *Nucleic Acids Research* 27: 4609-4618.
- Wassenberg, T. J. y Hill, B. J. 1987. Natural diet of the tiger shrimp *Penaeus esculentus* and *Penaeus semisculatus*. *Australian Journal of and marine freshwater Research* 38, 169-182.
- Wei-Jun Yang, Tsuyoshi Ohira, Naoaki Tsutsui, Thanumalaya Perumal Subramoniam, Do Thi Thanh Huong, Katsumi Aida, and Marcy N. Wilder. 2000. Determination of Amino Sequence and Site of mRNA Expression of Four Vitellins in the Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Experimental Zoology* 287: 413-422.
- <http://www.genome.gov/sglossary>
- Zúñiga-Aguilar J. J., y Godoy-Hernández. G., 2005. "Técnicas Avanzadas de Biología Molecular en Plantas: Análisis de la Expresión Génica Diferencial", Manual de curso teórico-practico (3-53Pp). "Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas" del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY).
- Zúñiga-Aguilar, J. J., Godoy-Hernández G., y González-Estada, Tomas.. 2002. "Técnicas Básicas de Biología Molecular en Plantas", Manual de 2º curso teórico-practico (2-20Pp). "Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas". Del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY).



II. ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Sistema de experimentación para el mantenimiento del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>).	11
Figura 2. Supervivencia de <i>Litopenaeus vannamei</i> expuestos a los cuatro tratamientos por 65 días.	27
Figura 3. Tasa de crecimiento del camarón blanco <i>L. vannamei</i> durante el experimento	28
Figura 4. Extracción de ARN total de hepatopáncreas por el método de Chomczynsky y Sachi (1987) en <i>Litopenaeus vannamei</i> .	29
Figura 5. Extracción de ARN total por el método de Chomczynsky y Sachi (1987), para la glándula digestiva (hepatopáncreas) de <i>Litopenaeus vannamei</i> extracciones lavadas con cloroformo-isoamilico.	30
Figura 6. Extracción de ARN total de la glándula digestiva (hepatopáncreas) en <i>Litopenaeus vannamei</i> con una variación en la metodología de Valenzuela, en el tratamiento #4.	31
Figura 7. Extracción de ARN total en <i>Litopenaeus vannamei</i> por la metodología de Valenzuela para todos tratamientos.	31
Figura 8. Comprobando la integridad del ARN total tratado con DNA-free en <i>Litopenaeus vannamei</i>	33
Figura 9. Comprobación de la cADN en muestras de la glándula digestiva (hepatopáncreas) de <i>Litopenaeus vannamei</i>	34
Figura 10. Comprobación de la integridad de ARN total de <i>Litopenaeus vannamei</i> contra otras muestras	34
Figura 11. Aplicación de la técnica del Despliegue Diferencial, en <i>Litopenaeus vannamei</i> para evaluar el efecto de la dieta	35
Figura 12. Síntesis de primera cadena a partir de los productos diferenciales en <i>Litopenaeus vannamei</i> , para tratamiento #3 contra control #5	36
Figura 13. Reamplificación de bandas diferenciales en <i>Litopenaeus vannamei</i> , del tratamiento #3.	36
Figura 14. Clona contra muestra #4 de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	37
Figura 15. Productos de mini preparación plasmídica de clones de <i>Litopenaeus vannamei</i> , por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio.	37
Figura 16. Restricción de muestras con enzima Eco RI, para todos los clones de <i>Litopenaeus vannamei</i>	38
Figura 17. Restricción de muestras con enzima Apa I/Pst I, para todos los clones de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	39
Figura 18. Restricción de muestras con enzima Not I, para todos los clones de <i>Litopenaeus vannamei</i>	39
Figura 19. Comparación de muestras, contra muestras de PCR amplificadas y ADN clon de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	40



12. ÍNDICE DE CUADROS.

	Página.
Cuadro 1. Composición de dietas artificiales para probarse en <i>L. vannamei</i>	12
Cuadro 2. Dietas artificiales probadas con cuatro tratamientos para camarones de (<i>L. vannamei</i>).	12
Cuadro 3. Fórmula para evaluar la concentración de ARN total en lecturas a 260 nm.	15
Cuadro 4. Programa de PCR, para correr la síntesis de primer cadena en muestras de ARN de (<i>L. vannamei</i>).	23
Cuadro 5. Programa para correr PCR de amplificación de Despliegue Diferencial, para (<i>L. vannamei</i>).	26
Cuadro 6. Peso obtenido de una poza de ocho glándulas digestivas (hepatopáncreas).	28
Cuadro 7. Lecturas a 260 nm para evaluar la concentración del ARN total en cada una de los tratamientos.	32
Cuadro 8. Despliegue Diferencial de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	35



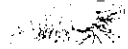
13. APÉNDICE

<i>Gel nativo de agarosa al 1 %.</i>	
• 30 ml.....de Buffer TAE IX.	
• 0.3 gr.....de Agarosa grado biología molecular.	
• 10 µg/ml.....de Bromuro de Etidio (BrEt).	

<i>Síntesis de la primer cadena enzima con SuperScript™ III. (Para un volumen de 20 µl).</i>	
• 1 µl.....Oligo (dT) ₂₀ .	
• 1 µl.....10 mM dNTP Mix.	
• 13 µl.....Agua Sigma (<i>RNase-free</i>).	
• 5 µl.....ARN total de la muestra tratada (<i>DNase-free</i>).	

<i>Gel desnaturalizante (6% acrilamida-bis-acrilamida 40%).</i>	
Reactivos	Volumen a utilizar
• TBE 5X	14 ml
• 7 M Urea	29.4 gr
• (6 %) Acrilamida-bis-acrilamida (40 %)	10.5 ml
• Agua destilada	Aforar a 70 ml
• TEMED	200 µl
• Persulfato de amonio (10 %)	400 µl

<i>Buffer (TAE IX).</i>	
Workin Solution	Stock Solution/Liter
• 40 mM Tris-acetato	• 242 gr Tris base
• 1 mM EDTA	• 57.1 ml Ácido acético glacial
	• 100 ml (0.5 M) EDTA. (pH 8)



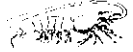
<i>Buffer de carga (Amortiguador 2X).</i>		
TAE	Glicerol (50 %)	Azul de bromofenol
2X	500 µl	500 µl

<i>10X DNase Buffer.</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 100 mM (Tris-Cl) Ph 7.5 • 25 mM (MgCl) • 1 mM (CaCl₂)

<i>Buffer TBE 5X (Aforar a 1 lt)</i>		
Elemento	Cantidad	Catalogo
• Tris	54 gr	161-0716
• Acido bórico	27.5 gr	161-0750
• (0.5 M) EDTA (Ph 8)	20 ml	161-0728

<i>Persulfato de Amonio (10 %)</i>	
Elemento	Cantidad
• Agua destilada	1 ml
• Persulfato de amonio	0.10 gr

<i>Buffer TBE 10x (Aforar a 1 lt).</i>		
Elemento	Cantidad	Catalogo
• Tris	108 gr	161-0716
• Acido Bórico	55 gr	161-0750
• EDTA	9.3 gr	161-0728
• Agua desionizada	Aforar a 1lt	



<i>Solución Fijadora (Fix-Stop).</i>	
Acido acético	200 ml
Agua destilada	Aforar a (1800 ml)

<i>Solución de Tinción (Staining Solution).</i>	
• (Ag NO₃) Nitrato de Plata	2 gr
• Formaldehido (37 %)	3 ml
• Agua Destilada	Aforar a (2 lts).

<i>Solución de Revelado.</i>	
• (Na₂CO₃) Carbonato de Sodio	60 gr
• Agua Destilada (Iero. Disolver Na₂CO₃)	2 lts (a 10 °C)
• Formaldehido (37 %)	3 ml
• Tiosulfato de Sodio (10 mg/ml)	400 µl

<i>Medio LB (1 lt).</i>	
• Triptona (Bacto®)	10 gr
• Extracto de levadura (Bacto®)	5 gr
• Cloruro de sodio	5 gr
• Hidróxido de Sodio	Ajustar (Ph 7)

<i>Elaboración de placas con medio LB (Ampicilina 100 µg/ml).</i>	
• Medio LB	500 ml
• Agar	7 gr



<i>Preparación de medio LB con Ampicilina (500ml)</i>	
• Triptona (Bacto®)	5 gr
• Extracto de levadura (Bacto®)	2.5 gr
• Cloruro de sodio	2.5 gr
• Hidróxido de Sodio	Para ajustar (Ph 7)

<i>Cebadores/Primer, para prueba del Despliegue Diferencial.</i>	
Cebadores/Primers.	Secuencia.
• Oligo (P1T1)	5' -ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA- 3' 5' -CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTAA- 3'
• Oligo (P9T7)	5' -ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG- 3' 5' -CATTATGCTGAGTGATACTTTTTTTTTCT- 3'
• Oligo (P9T6)	5' -ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG- 3' 5' -CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGA- 3'