

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN AGRONOMÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL LEGAL

**Caracterización genética de la crustacianina del camarón
Penaeus vannamei y su expresión con respecto a la
madurez gonádica de organismos cultivados y silvestres**

Presentador del Servicio Social

Rodrigo de Jesús Pérez Gala

Número de cuenta: 2143059510

Asesor Interno

Dr. David Salero Montiel

Número económico: 10847

Asesor Externo



Dra. Laura Rebeca Jiménez Gutiérrez



Dra. Laura Rebeca Jiménez Gutiérrez

Lugar de realización:

Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias del Mar. Mazatlán
Sinaloa.

Fecha de inicio: 28 de septiembre de 2019.

Fecha de término: 28 de marzo de 2020.

ÍNDICE

1.-	RESUMEN.....	1
2.-	INTRODUCCIÓN.....	1
3.-	MARCO TEÓRICO	3
3.1.-	Importancia del camarón.....	3
3.1.1.-	Antecedentes históricos y ciclo de vida del camarón	3
3.2.-	Hábitos dietas formuladas alimenticios y dietas formuladas	4
3.2.1.-	Hábitos alimenticios y Dietas formuladas	4
3.2.1.1.-	Aparato digestivo	4
3.2.2.-	Carotenoides	5
4.-	OBJETIVOS	6
4.1.-	Objetivo general.....	6
4.2.-	Objetivos específicos	6
5.-	METODOLOGÍA.....	6
5.1.-	Ubicación geográfica.....	6
5.2.-	Diseño experimental	6
5.3.-	Secuenciación y análisis bioinformático.....	7
5.4.-	Prueba de cebadores y establecimiento de <i>T_m</i>	8
5.5.-	Extracción de RNA.....	8

5.6.- Síntesis de cDNA y amplificación de las secuencias de <i>Crn</i>	9
6.- Actividades realizadas	10
7.- OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS	10
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
9.- CONCLUSIONES	13
10.- RECOMENDACIONES.....	14
11.- AGRADECIMIENTOS.....	14
12.- BIBLIOGRAFÍA.....	15

1.- RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias del Mar. Recientemente se ha reportado una íntima relación de la alimentación con el desarrollo reproductivo de los camarones silvestres y cultivados. Incluyendo el consumo de carotenoides asociados a la proteína Crustacianina (*Crn*). Con el objetivo de evaluar dicha relación, se utilizaron ovarios de *Penaeus vannamei*, de origen silvestre (OrgS) capturados al este del Pacífico de dos colectas, en noviembre 2018 y marzo 2019, además de organismos de la granja (OrgG) Fitmar, ubicada en el Walamo Mazatlán. Se tomaron en cuenta dos estadios ováricos: previtelogenico y vitelogenico para la evaluación de la expresión génica de dos subunidades de *Crn*: *Crn A1* y *Crn C1*. Se realizó un análisis bioinformático con el cual se obtuvo la caracterización de las secuencias nucleotídicas y se diseñaron dos pares de cebadores para la amplificación de cada secuencia. Como resultados se encontró una diferencia en la expresión de *Crn*, en sus diferentes subunidades entre los OrgS y los OrgG. En los OrgS se encontró la variación de *Crn* en función de las fechas de muestreo.

2.- INTRODUCCIÓN

Anteriormente se consideraba a los recursos marinos como una fuente inagotable de alimentos, situación que condujo a una fuerte sobreexplotación pesquera, principalmente de las especies de mayor interés económico como son los crustáceos y en particular el camarón. Para el Pacífico mexicano las especies de mayor captura son las del género *Penaeus*, particularmente el camarón café *P. californiensis*, el camarón azul *P. stylirostris*, el camarón blanco *P. vannamei*, y el camarón cristal *P. brevistris*, teniéndose las mayores capturas en los estados de Sinaloa y Sonora (Gillett, 2010; Navarro-Sampayo, 2019). No obstante, en la acuicultura solamente se cultiva *P. vannamei*, principalmente en estanques de cultivo semi-intensivo e intensivo, donde, contrario a la producción pesquera, en la

actualidad la producción acuícola se encuentra en crecimiento exponencial (Chávez, 1993; CONAPESCA, 2018; INAPESCA, 2018).

El camarón blanco se ha cimentado como la única especie cultivada para el país debido a su facilidad de cultivo y por su gran tolerancia a los cambios ambientales (Flores, 2007; INAPESCA, 2018). Sin embargo, uno de los elementos de mayor costo en la producción acuícola es la alimentación de los animales (Fox, 2001). Aunque las dietas están formuladas para cubrir los requerimientos nutricionales de cada especie, en la gran mayoría de los casos tiene una gran influencia en el sabor del producto final, sobre todo en comparación a los organismos silvestres con dieta natural (Molina, 2008).

Lo anterior no solo tiene efectos paliativos, sino que además puede provocar diferencias en la pigmentación de ciertos tejidos, incluyendo la gónada en estadios de madurez avanzados. Los pigmentos en los crustáceos pueden dividirse en dos grupos: a) Aquellos que cumplen una función colorativa (carotenoides) y b) los que cumplen funciones fisiológicas, como las hemocianinas (Goodwin, 1960; Quintana et al 2018). No obstante, se ha reportado que los carotenoides pueden llegar a tener capacidad antioxidante, inactivar proteínas y prevenir daños a niveles de RNA y DNA (Meléndez, 2017). También pueden servir como un estimulante para el desarrollo del camarón y promover la supervivencia de este (Ponce, 2006).

El carotenoide Astaxantina (Axt) es encontrado principalmente en el hepatopáncreas, hemolinfa y ojos (Goodwin, 1960). En los crustáceos la Axt se une a una proteína llamada crustacianina (*Crn*). La α -*Crn* es un complejo multimérico formando por ocho β -*Crn* unidas a dos Axt (Christensson et al, 2013; Gamiz-Hernandez et al, 2015). La β -*Crn* es responsable del color azul de los crustáceos, lo que genera que, con las altas temperaturas de la cocción, se desnaturalice la α -*Crn* y libere la Axt del complejo, resultando en el color rojo característico (Gamiz-Hernandez et al, 2015).

3.- MARCO TEÓRICO

3.1.- Importancia del camarón

3.1.1.- Antecedentes históricos y ciclo de vida del camarón

La camaronicultura en México comenzó aproximadamente en los años treinta, sin embargo, en la década de los 70's, México logra su mayor actividad camaronícola con el cultivo de la especie *P. stylirostris* cuyo principal mercado era Estados Unidos (Lobato, 1992). No obstante, esta especie fue remplazada por *P. vannamei* ya que poseía mayor resistencia a enfermedades y mayor tolerancia a los cambios del medio (Lobato, 1992; Bortolini, 2004; Flores, 2007; INAPESCA, 2018). Por lo que se estima que para el 2030 cerca del 60% de los productos de consumo humano provendrán de la acuacultura (Food, 2018).

Sin embargo, al igual que con cualquier especie, para mantener la sustentabilidad del recurso tanto en la pesquería, como en cultivo, es indispensable entender su fisiología y conocer su ciclo de vida, ya que los camarones migran durante las diferentes etapas de sus vidas a través de diversos biotipos los cuales están en función de su gradiente de salinidad. Los cambios de fase están acompañados de modificaciones en la conducta alimenticia, y metabólica (García, 1986; Fenucci, 1998).

Los camarones peneidos en general desovan frente a las costas, las larvas eclosionan y forman parte del zooplancton, al llegar a post-larvas entran en estuarios y lagunas costeras y residen ahí hasta la etapa de juvenil (Caballero, 2006). Posteriormente, se da una segunda migración hacia la boca de las lagunas o estuarios para dar paso a la siguiente fase en donde se convierten a sub-adultos. Finalmente se genera migración hacia mar adentro, donde se continúa el crecimiento hasta alcanzar su estado adulto y trasladarse a las zonas de reproducción (Caballero, 2006).

3.2.- Hábitos dietas formuladas alimenticios y dietas formuladas

3.2.1.- Hábitos alimenticios y Dietas formuladas

Los camarones peneidos son omnívoros oportunistas, los cuales presentan una amplia gama de enzimas digestivas como: proteasas, endoproteasas, exoproteasas, esterases, lipasas, amilasas, maltasas, sucrasas, quitinasas y celulasas (Fox, 2001). Dichas enzimas pueden variar durante su ciclo de vida (Molina, 2008), incluso entre especies, por ejemplo *P. stylirostris* presenta una mayor preferencia carnívora, mientras que *P. vannamei* prefiere consumir alimentos vegetales o detritus. Por tal motivo, las dietas formuladas están en función de las preferencias de la especie y del ciclo de vida del animal, y tratando de emular lo más posible el alimento natural (Fox, 2001; Molina, 2008).

El alimento natural puede estar constituido por los siguientes elementos: fitoplancton, zooplancton, organismos bentónicos, mientras que el alimento artificial en términos cuantitativos se base en la composición de macronutrientes como proteínas, lípidos y carbohidratos y micronutrientes como minerales y vitaminas. Adicionalmente, el alimento artificial se compone de ingredientes no nutricionales como: aditivos aglutinantes, antibióticos, conservadores, pigmentos y antioxidantes (Fox, 2001; Molina, 2008).

3.2.1.1.- Aparato digestivo

El tracto digestivo de los crustáceos tiene la función de transporte de nutrientes, digestión, hidrólisis química, absorción celular, almacenamiento de nutrientes y la transferencia de excretas. En los peneidos existe una glándula digestiva también llamada hepatopáncreas, cuya función es de llevar a cabo la síntesis de enzimas digestivas, la digestión y absorción del alimento, excreción y reserva de compuestos inorgánicos, metabolismo de lípidos y carbohidratos y el catabolismo de otros

compuestos orgánicos y es también el sitio de reserva de nutrientes (Caballero, 2006).

El hepatopáncreas también está involucrado en otros procesos fisiológicos como es la reproducción, ya que es el sitio de síntesis extra ovárica de la vitelogenina, la cual es la principal proteína del vitelo de los ovocitos de las hembras. Por lo tanto, el hepatopáncreas contribuye a su posterior transformación a una carotenoglicoproteína (Jiménez-Gutiérrez et al., 2019).

3.2.2.- Carotenoides

Además de los macro y micronutrientes, el alimento natural contiene una gran cantidad de pigmentos, los cuales ayudan a proveer de coloración externa a los animales, en ciertos casos también son sintetizados por los mismos camarones, a través de células denominadas cromatóforos, las cuales están influenciadas por hormonas péptidas, por tal motivo, uno de los carotenos con mayor presencia en cantidad y distribución en los crustáceos es la Axt (Goodwin, 1960; Roldan, 2012; Meléndez, 2017).

En la camaronicultura se han probado las bondades de la adición de Axt en las dietas. Los camarones alimentados con este pigmento no sufren de un impacto significativo al someterse a variaciones de oxigenación, presencia de amonio, y de igual manera al medir la relación de $O:N$, se encontró que esta provoca una mejor metabolización del alimento, además de reducir la susceptibilidad a enfermedades, no obstante, en los camarones, la Axt solo se encuentra formando parte del complejo *Crn-Axt* (Ponce, 2006).

Se logró identificar a los transcritos que codifican para las subunidades *Crn-A1*, *Crn-A2* y *Crn-C*. Al mismo tiempo que se ha observado que en organismos silvestres, la coloración de las gónadas de las diferentes especies de peneidos se torna de un rojizo intenso en los estadios de mayor madurez gonádica, no así, en organismos cultivados, por lo que se asume que dicho fenómeno está directamente asociado

con la alimentación natural, por lo que es importante evaluar la presencia de dichos carotenos en la alimentación, así como la expresión de la *Crn*, tanto en organismos cultivaos, como silvestres.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

Caracterizar las secuencias nucleotídicas y deducidas de aminoácidos de la crustacianina del camarón *Penaeus vannamei* y evaluar su expresión con respecto a la madurez gonádica de organismos cultivados y silvestres.

4.2.- Objetivos específicos

- Extraer ARN de muestras de ovarios de *P. vannamei*.
 - Sintetizar ADNc a partir de ARN de *P. vannamei*.
- Evaluar la expresión génica respecto a la madures gonádica de *P. vannamei*

5.- METODOLOGÍA

5.1.- Ubicación geográfica

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Pesquerías, en la Facultad de Ciencias del Mar, de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

5.2.- Diseño experimental

Las muestras de ovarios se obtuvieron a partir de hembras de *P. vannamei*, cuyo origen es de mar abierto, en dos ciclos de muestreos (noviembre 2018 y marzo 2019) en el Este del Pacífico, así como de la granja Fitmar ubicada en Walamo Mazatlán. Se tomaron muestras de ovarios de cuatro organismos para cada factor

(Mar con dos niveles (OrgS) y Granja (OrgG)), a partir de los cuales se extrajo el ARN.

Se configuró un diseño experimental completamente al azar. Como unidad experimental se tomaron los ovarios de *P. vannamei*, en estado de madurez y con dos niveles: Pre-vitelogenicos (I y II) y Vitelogenicos (IV y V). El origen de la muestra fue: mar abierto y de granja. El origen de mar abierto también fue de dos niveles: Los niveles correspondieron a las fechas de muestreo (noviembre 2018 y marzo 2019), para un diseño con tratamientos 3x2.

5.3.- Secuenciación y análisis bioinformático

El grupo de laboratorio ya contaba con transcriptomas de los tejidos de las gónadas del camarón *P. vannamei*. Con base en ello, se identificaron las secuencias de la *Crn* del camarón. Las secuencias obtenidas se caracterizaron y analizaron usando el algoritmo *clustalW*, posteriormente se realizó un análisis de secuencias depositadas en el GenBank usando el algoritmo BLAST, identificando los codones de inicio y terminación de cada secuencia.

Para obtención de la secuencia deducida de aminoácidos de cada subunidad se usó la herramienta *EXPASY translate tool* (<http://web.expasy.org/translate/>); con la que se calculó el peso molecular, y el punto isoeléctrico (pI) de cada secuencia usando el algoritmo *ProtParam Tool*. Para el diseño de cebadores se realizó un alineamiento de las secuencias de la *Crn* por medio del algoritmo *clustalW* y con base en esto se diseñaron los cebadores específicos, que por medio del programa *FastPCR* se diseñaron dos pares de cebadores para cada subunidad de crustacianina (*Crn A1* y *Crn C1*), teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Una *Tm* en un rango de 55 °C con 1 °C ± entre pares de cebadores.
- Con al menos 50% de GC en los cebadores.

- La terminación G/C para cada cebador.
- Que no exista complementariedad entre secuencias y pares de cebadores.
- La no formación de dímeros y horquillas.

5.4.- Prueba de cebadores y establecimiento de T_m

Se realizaron pruebas en cada juego de cebadores (*Crn A1* y *Crn C1*), para determinar la T_m más efectiva durante la amplificación. A partir de muestras de ovario de *P. vannamei*, se sometieron cada juego de cebadores *Crn A1 Fw1+Rv1*, *Crn A1 Fw2+Rv2*, *Crn C1 Fw1+Rv1* y *Crn C1 Fw2+Rv2*. Esto en un rango de los 52 °C a 54 °C para el T_m .

5.5.- Extracción de RNA

Se utilizaron muestras de ovarios, donde se extrajo el RNA total a partir de 100 mg de cada tejido por medio del kit TRI Reagent de acuerdo con las condiciones del fabricante. La concentración de RNA total se cuantificó por medio de espectrofotómetro NanoDrop a una relación 260:280, conservando solo las muestras con resultado de relación muy cercana a 2 (A_{260}/A_{280}). Adicionalmente se verificó la integridad de los RNA en condiciones nativas en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X con SYBR Safe al 0.1% (Invitrogen, USA). Las electroforesis se realizaron en una cámara Mini Sub Cell GT Systems (Bio Rad, USA). Aquellas muestras que presentaron degradación fueron descartadas y conservando aquellas con el RNA íntegro (Fig. 1).

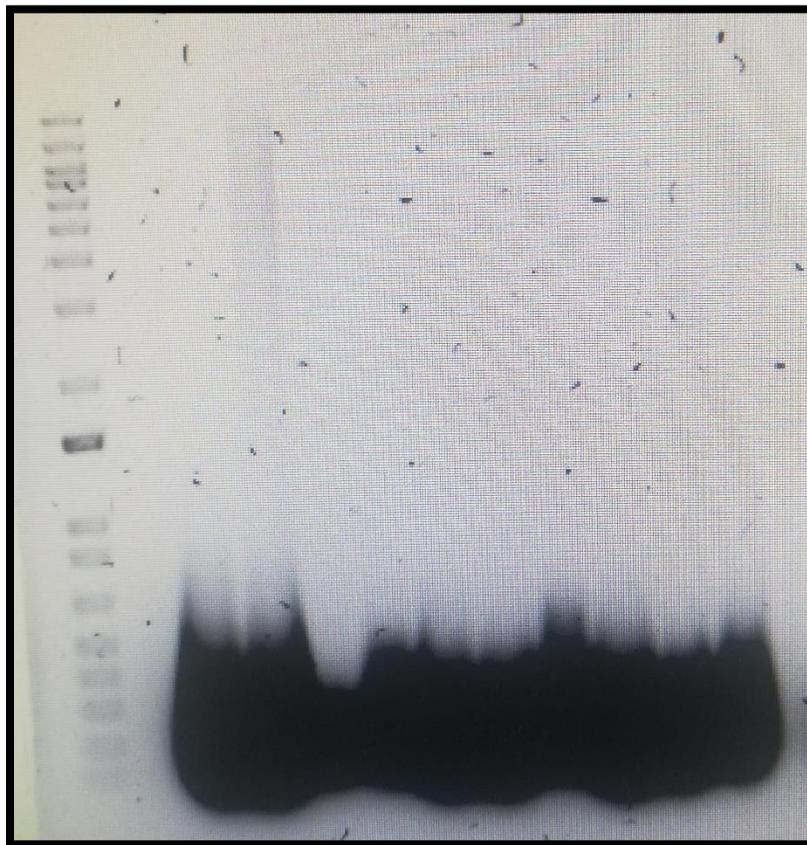


Fig. 1. RNA de diferentes muestras sin degradación.

5.6.- Síntesis de cDNA y amplificación de las secuencias de *Crn*

Las secuencias nucleotídicas de *Crn* se obtuvieron a partir de la síntesis del DNA complementario (cDNA) usando el kit comercial First Strand (Invitrogen, USA) y utilizando las especificaciones del fabricante. La amplificación se llevó con la Reacción en Cadena Polimerasa (*PCR*). Para cada gen se usó el *Taq PCR Master Mix* (Qiagen TM U.S.A.) con las siguientes especificaciones para cada reacción: 12.5 μ L de Top Taq mix, 2.5 μ L de colorante Coral, 1 μ L de cada iniciador 20 μ M, templado 2500 ng (cDNA) de cada tejido, y agua milliQ (C.B. P). para llegar a un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de amplificación que se utilizó fueron las siguientes: 94°C por 2 min, 55°C por 1 min y 72°C por 3 min (1 ciclo), 94°C por 1 min, 42°C por 1 min y 72°C por 3 min (1 ciclo), y 30 ciclos de 94°C por 1 min, la *Tm*

de alineamiento de cada par de iniciadores (52 °C a 53 °C) por 1 min y 72°C por 1 min, además de una extensión de 72°C por 10 min. El producto de PCR resultante se analizó en geles de agarosa 1.5%. Y todos los geles se documentaron por medio de un fotodocumentador Gel Doc TM EZ (Bio-Rad, USA) (Jiménez-Gutiérrez et al., 2019).

6.- Actividades realizadas

Durante el Servicio Social se realizaron las siguientes actividades:

- Análisis ontológico de secuencias de *P. vannamei*.
- Ubicación de dominios y zonas ORF para *Crm A1* y *Crm C1*.
- Diseño de cebadores.
- Extracción de RNA y síntesis de cDNA.
- Amplificación de Genes para *Crm A1* y *Crm C1* por medio de PCR.
- Electroforesis y fotodocumentación del producto de PCR.

7.- OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

- Se logró evaluar la expresión génica respecto a la madurez gonádica de *P. vannamei* de organismos cultivados y silvestres.
- Los objetivos específicos se cumplieron al lograrse las extracciones de RNA, síntesis de cDNA.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez se llevó acabo el análisis bioinformático de cada secuencia de *Crm* tanto para A1, como para C1. Esto usando el programa *EXPASY translate tool* y *ProtParam Tool*, con los cuales se caracterizaron las secuencias. Determinados para cada una de estas el marco abierto de lectura (ORF), número de aminoácidos que componen cada una de las proteínas y su punto isoeléctrico

Crustacianina	A1	C1
Codón de inicio	52 pb	216 pb
Codón de termino	646 pb	1166 pb
Numero de aminoácidos	709	2166
Peso molecular	59805.22	181033.96
Punto isoeléctrico	5.09	4.92

Fig. 2 Caracterización génica de *Crn A1* y *C1*.

A partir de cada par de juegos de cebadores diseñados para la amplificación de *Crn* en sus dos subunidades *Crn A1* y *Crn C1*. Se obtuvo como resultado lo siguiente: La subunidad *Crn A1* y *Crn C1* el par de cebadores Fw2+Rv2 fueron los que presentaron amplificación durante la PCR. Una vez establecido el juego de cebadores, se probó a diferentes *Tm*. Siendo la *Tm* que presentó mejores resultados de amplificación y sin generar subproductos fue para *Crn A1* 53 °C y *Crn C1* a 53 °C.

Con el juego de cebadores ya establecido, se realizó la PCR para el cDNA de las muestras con dos replicas y una sub-replicas con los que se obtuvieron los siguientes resultados (Fig. 3).

<i>P. vannamei</i>	<i>Crn A1</i>	<i>Crn C1</i> ***
Granja		presencia
Mar abierto	Presencia	

Fig. 3. Presencia en estados previtelogenicos en muestras de granja y mar abierto. *Nota:* **indican una mayor presencia en estados previtelogenicos.

Los resultados presentados indican que existió una variación entre la expresión de *Crn A1* y *Crn C1*. La mayor expresión de *Crn A1* se encontró en organismos silvestres. Contrario a *Crn C1*, cuya mayor expresión se encontró organismos cultivados (Fig. 4). Se sugieren que estas variaciones son influenciadas por las diferentes dietas entre ambos organismos, siendo la de los organismos de mar

abierto (OrS) son en su mayoría carroñeros, y una dieta que consiste en alimentarse de crustáceos más pequeños, peces, moluscos, plantas acuáticas y detritus orgánicos, por lo que presentan una mayor disponibilidad de carotenoides en su dieta respecto a los que provienen de granjas (Montes et al., 2020).

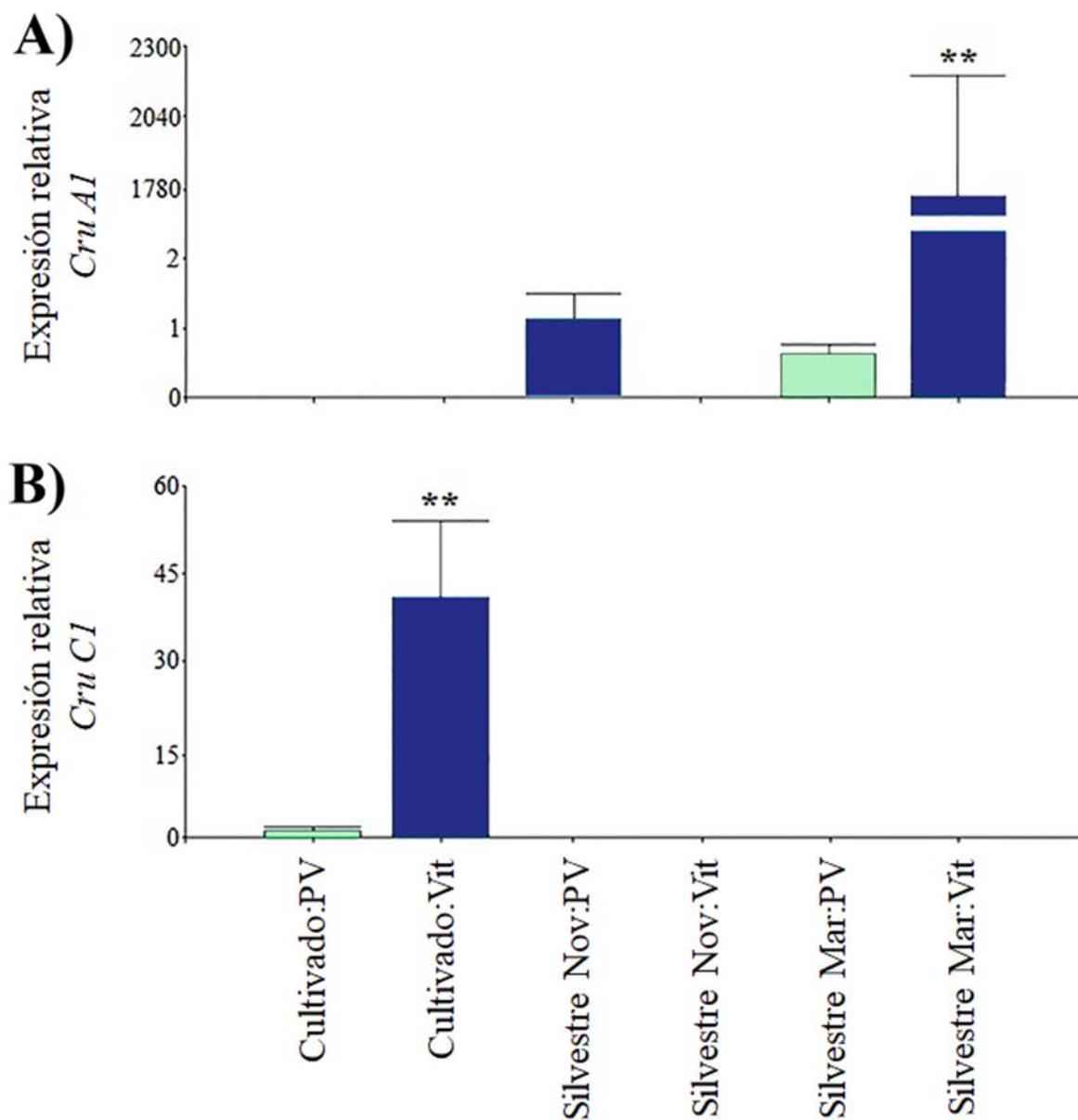


Figura 5. Expresión relativa de *Cru A1* y *Cru C1* en organismos silvestres y cultivados en diferentes estadios vitelogénicos. Pv: Previtelogénico. Vit: Vitelogénico. Nov: Noviembre. Mar: Marzo. $n=4$. ** indica diferencias altamente significativas a $P \leq 0.05$.

De acuerdo con los resultados se encontró una variaron en la expresión de *Crn A1* entre los camarones de mar abierto, variando esta respecto a la fecha de muestreo. Observándose visualmente una coloración roja en los ovarios de muestras de marzo, signo de una mayor presencia de carotenoides, respecto a los OrgS de noviembre, esto muy probablemente a las diferencias en sus ciclos biológicos y la disponibilidad de alimento al cual tienen acceso (Fig. 4) (Thongda et al., 2015; Jiménez - Gutiérrez et al., 2019).

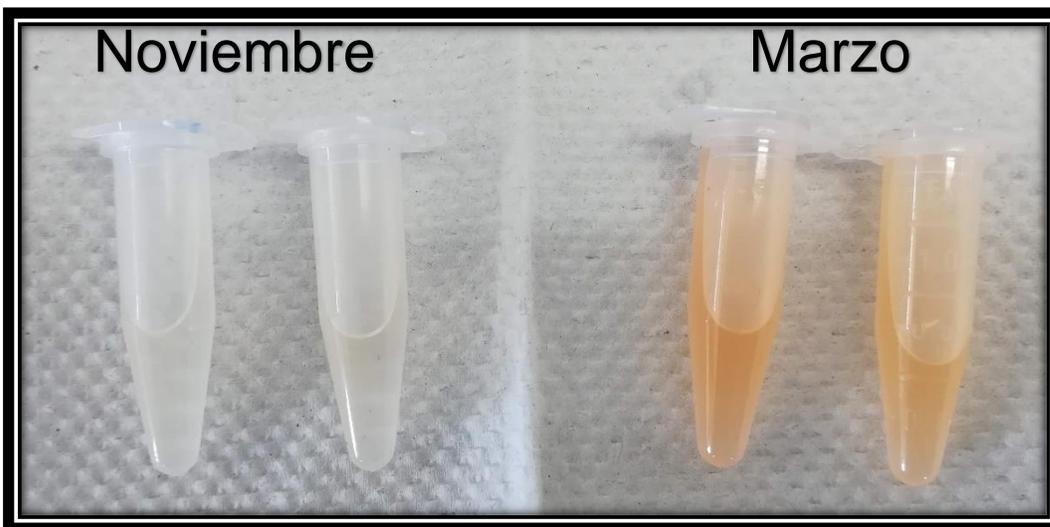


Fig. 6. Concentración de carotenoides en muestras de ovario silvestres de *P. vannamei* colectadas en marzo y noviembre.

9.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados encontrados y de la evaluación en la expresión génica se concluye lo siguiente:

- Existió una variación en la expresión génica de *Crn*, entre organismos de *P. vannamei* de origen silvestre y granja.
- Las subunidades de *Crn A1* y *Crn C1* presenta variaciones en su expresión con respecto a la fecha de muestreo y al origen de los organismos.

10.- RECOMENDACIONES

- Seguir el monitoreo de los camarones de mar abierto como de granja.
- Un monitoreo de camarones silvestres entre los estadios previtelogenicos y vitelogenicos con fin del detectar expresión de *Crn A1* y *Crn C1*.
- Llevar acabo bioensayos con base en la variación de fuentes de carotenoides, teniendo en cuenta La ley del mínimo de Liebig, para determinar si es algún factor limitante independiente a los carotenoides que influye en la expresión de *Crn*.
- Entre los diferentes estadios de maduración de *P. vannamei* pruebas a fin de detectar variaciones en la expresión de *Crn A1* y *Crn C1*.

11.- AGRADECIMIENTOS

Al profesor David Montiel por su apoyo como Asesor durante el Servicio Social, y en no menor medida durante la carrera. A la Dra. Laura Rebeca Jiménez Gutiérrez, Catedrática de CONACYT al aceptar ser mi Asesora Externa del Servicio Social, y permitirme colaborar en su proyecto de investigación. Por su paciencia, su dedicación al enseñarme las técnicas de la Biología Molecular, al fomentar un mayor orden y disciplina en mí trabajo. Al pasante de Maestría Jorge Lizárraga, amigo y hermano que me acompañó, ayudo y aconsejo durante mi estancia en el laboratorio. Por la invaluable y gran amistad que me brindo. Al Dr. Francisco Martínez de la Universidad Industrial de Santander, por brindarme la confianza, y su apoyo al recomendarme con la Dra. Laura. Y encaminarme a la Genética y Biología Molecular.

12.- BIBLIOGRAFÍA

1. Bortolini, J. & Torres P. (2004). La camaronicultura en México. Consultado en septiembre 2017, De Ciencias sitio web: <https://www.revistaciencias.unam.mx/en/77-revistas/revista-ciencias-76/612-la-camaronicultura-en-mexico.html>
2. Caballero, P. (2006). Factores que afectan la tasa de ingestión de camarones peneidos: comparación de dos especies (*Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767 y *L. vannamei* Boone, 1931). Consultado en septiembre 2019, de Facultad de Ciencias UNAM Sitio web: <http://piecemo.sisal.unam.mx/cgi-bin/dl.cgi?id=51>
3. Chávez, C. (1993). El estado actual de la acuicultura en México y perfiles de nutrición y alimentación. Consultado en agosto 2019, de FAO - Centro Regional de Investigación Pesquera Instituto Nacional de la Pesca Sitio web: <http://www.fao.org/3/ab487s/AB487S10.htm#ch8.1.6>
4. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). (2018). Capítulo I. Fichas Estadísticas. En Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Edición 2017 (p. 27). SAGARPA. (no publicado).
5. Fenucci, J. (1988). Manual para la cría de camarones peneidos. Consultado en septiembre 2019, De Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación sitio web: <http://www.fao.org/3/ab466s/ab466s00.htm#toc>
6. Flores, M. (2007). Efecto de astaxantina sobre respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* aclimatado a baja salinidad. Ensenada, Baja California, México: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
7. Food. (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018 (Sofía): Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Place of publication not identified: Food & Agriculture Org.

8. Fox, J. 2001. Nutrición y manejo del alimento. En métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica. M.C., Haws y C.E., Boyd (eds). Pp. 65-90. Managua, Nicaragua.
9. Gamiz A. Neycheva I. Send R. Sundholm D. & Ville K. (2015). Protein-Induced Color Shift of Carotenoids in β -Crustacyanin. *Angew. Chem*, 54, pp. 11564 – 1156.
10. García, S. & Le Reste L., (1986) Ciclos vitales, dinámica, explotación y ordenación de las poblaciones de camarones peneidos costeros. *FAO Doc. Téc. Pesca*, (203) p. 180.
11. Gillett, R. (2010). Estudio mundial sobre las pesquerías del camarón. Septiembre 2019, de FAO Sitio web: <http://www.fao.org/3/i0300s/i0300s.pdf>
12. Goodwin, T. (1960). Biochemistry of pigments. In T. H. Waterman (ed.). *The physiology of Crustacea*, Vol. I. Academic Press, pp. 101-140 New York.
13. Jiménez, S. Cadena, C. Barrios, C. Pérez, R. Martínez, F. & Jiménez, L. (2019). Crustacean vitellogenin: a systematic and experimental analysis of their genes, genomes, mRNAs and proteins; and perspective to Next Generation Sequencing. Septiembre 2019.
14. Lobato, P. (1992). Estudio socioeconómico del cultivo de camarón realizado por sociedades cooperativas. Consultado en septiembre 2019, de FAO sitio web: <http://www.fao.org/3/ab493s/ab493s00.htm#toc>
15. Instituto Nacional de Pesca. (2018). Acuicultura | Camarón blanco del Pacífico. Agosto 2019, de INAPESCA Sitio web: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-camaron-blanco-del-pacifico>
16. Meléndez, A. (2017). Carotenoides: estructura, propiedades y funciones. En *Carotenoides en agroalimentación y salud* (p. 12). México: Editorial Terracota, SA de CV.

17. Molina, C. & Villareal, H. (2008). Estrategias de Alimentación en la Etapa de Engorda del Editores: Cesar Molina-Poveda Humberto Villarreal-Colmenares Camarón. Consultado en septiembre 2019, de CYTED Sitio web: <https://www.cibnor.gob.mx/images/stories/biohelis/pdfs/Estrategias-de-alimentacion-en-la-etapa-de-engorda-del-camaron.pdf>
18. Montes. L, Avena. A, Lizárraga. J, Pérez R, Jiménez. S, Sotelo. A, Martínez. F, Muñoz. H, Chávez. D, Jiménez. L. (2020). Cultured and wild shrimp *Penaeus vannamei* vitellogenesis. Next generation sequences and relative expression of directly and indirectly reproduction related genes. abril 2020, de Universidad Autónoma de Sinaloa
19. Ponce J., Arredondo, J. & Vernon, E. (2006). Carotenoids from plants used in diets for the culture of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Revista mexicana de Ingeniería Química, vol. 5, pp: 157 -165.
20. Quintana, A. Hurtado, M. Hernández, C. & Palacios E. (2018). Carotenoides. ¿Qué son y para qué se usan? Ciencia, Vol. 69 número 4, pp. 50 -55.
21. Roldan, M. (2012). Efecto del ambiente lumínico en la coloración del camarón ornamental *Lysmata boggei*. Ciudad de México: UNAM.
22. Thongda W, Chung JS, Tsutsui N, Zmora N, Katenta A. 2015. Seasonal variations in reproductive activity of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Vitellogenin expression and levels of vitellogenin in the hemolymph during ovarian development. Comp. Biochem. Physiol., (A, Mol. Integr. Physiol.) 179: 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.08.019>.