

Transcriptómica, la Nueva Puerta de Conocimiento para la Nutrición en Acuicultura: Actividad Enzimática Digestiva en Larvas de Crustáceos

Gloria Helena Ospina-Salazar^{1*}, Anselmo Miranda-Baeza², Juan F. Alzate³, Sven Zea¹

¹ CECIMAR, Universidad Nacional de Colombia, Sede Caribe

² Universidad Estatal de Sonora, Unidad Académica Navojoa, Sonora, México.

³ Centro Nacional de Secuenciación genómica-CNSG, Sede de Investigación Universitaria-SIU, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

*E-mail: ghospinas@unal.edu.co

Resumen

El conocimiento del transcriptoma y su regulación es fundamental para la interpretación articulada de los diversos constituyentes moleculares que integran la red de respuesta génica de un individuo ante un evento inductor. La expresión o transcripción de los genes se ha implementado recientemente en estudios nutricionales de larvas. Las investigaciones que combinan los mecanismos reguladores de la expresión de genes con la actividad de las enzimas digestivas durante el desarrollo larval en peces son escasas y aún más en crustáceos.

En el presente documento se abordan algunos de los aspectos relevantes relacionados con el potencial de la transcriptómica en el estudio de la nutrición de larvas de crustáceos de interés comercial.

Palabras clave: Enzimas digestivas, Larvas crustáceos, Nutrición larvas, Transcriptómica

Introducción

El cultivo de crustáceos de importancia comercial comprende un amplio número de especies. En el mundo camarones langostas y cangrejos son cultivados mundialmente como fuente de alimento. La mayoría de estas especies producen un gran número de huevos, no obstante, la supervivencia y desarrollo exitoso de las larvas dependen de diversos factores, que representan grandes retos durante el proceso de producción. Las larvas de algunos crustáceos como los braquiópodos (*Artemia*), copépodos (*Tigriopus*) y Peneidos (*Penaeus*), eclosionan como nauplios, inicialmente lecitotróficas, pero en pocos días u horas se convierten en fitotróficas. En contraste la mayoría de decápodos eclosionan en un estado avanzado de zoea que usualmente es zootrófica desde su nacimiento (Jones *et al.* 1997b). A pesar de las diferencias entre ellas, es importante que los alimentos suministrados durante estos estadios provean los nutrientes necesarios para un adecuado desarrollo, el cual finalmente deberá reflejarse en mayores tasas de supervivencia y crecimiento.

La morfología del tracto digestivo durante el desarrollo ontogénico de las larvas es similar en la mayoría de decápodos. El desarrollo de los órganos secretores de enzimas digestivas como el hepatopáncreas son fundamentales para definir en el tipo de alimento que puede ser suministrado (De Silva y Anderson, 1995; Jones *et al.* 1997b; Houlihan *et al.* 2001). Estudios cuantitativos de las enzimas digestivas en grupos taxonómicos relativamente cercanos han revelado diferencias relacionadas con las fuentes de alimento disponibles. Altos niveles de proteasas y pocos de carbohidrasas son usuales en especies carnívoras y en sentido inverso para las herbívoras, mientras que los detritívoros y omnívoros se encuentran presumiblemente en una posición intermedia (Sather, 1969; Brun y Wojtowicz, 1976). Bajo este contexto, el análisis de la actividad enzimática en decápodos como langostas y cangrejos, ha demostrado ser una aproximación efectiva para entender la fisiología digestiva y determinar las características del alimento que debe ser suministrado (Hirche y Anger, 1987; Biesiot y Capuzzo, 1990; Lovett y Felder, 1990; Harms *et al.* 1991; Kamarudin *et al.* 1994; Saborowski *et al.* 2006; Rotllant *et al.* 2008; Andrés *et al.* 2010).

La expresión o transcripción de los genes se ha implementado recientemente en estudios nutricionales de larvas (Rodríguez *et al.* 2012). Las investigaciones que combinan los mecanismos reguladores de la expresión de genes con la actividad de las enzimas digestivas

durante el desarrollo larval son escasas en peces y aún más en crustáceos. Los pocos estudios desarrollados han permitido conocer de manera preliminar el comportamiento de las principales enzimas digestivas, relacionando algunas proteasas, lipasas, amilasas y enterasas con su expresión génica en algunas especies de camarones y de cangrejos adultos; mientras que en larvas solo hay estudios en camarones de los géneros *Penaeus* y *Litopenaeus*. Dichas investigaciones han estudiado las respuestas de las enzimas durante el desarrollo larval frente a diferentes dietas (Hirche y Anger, 1987; Harms *et al.* 1994; Klein *et al.* 1998; Sellos y van Wormhoudt, 1999; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003; Van Wormhoudt y Sellos, 2003, Saborowski *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2007; Rotllant *et al.* 2008; Andrés *et al.* 2010; Rivera-Perez *et al.* 2011).

El entendimiento del transcriptoma representa un gran potencial por descubrir en el campo de la nutrición, y al integrarse con otras ciencias moleculares como la proteómica, metabolómica y bioinformática, puede facilitar el descubrimiento de proteínas claves que regulan las rutas metabólicas importantes (Castellanos *et al.* 2004; Rodrigues *et al.* 2012), en especial en aquellas relacionadas con la nutrición de los organismos acuáticos de interés comercial.

Alimentación y actividad enzimática

La alimentación tiene efectos directos sobre la actividad enzimática digestiva, en ella se reflejan las adaptaciones a la disponibilidad y calidad del alimento suministrado. La nutrición es uno de los factores más importantes que influyen sobre las tasas de crecimiento y supervivencia (Felgenhauer *et al.* 1989; Le Vay *et al.* 2001). Algunos autores indican que con exceso de alimento, como ocurre al cultivar las larvas de crustáceos, los niveles de las enzimas digestivas se ven reducidos, ya que los requerimientos energéticos se alcanzan sin necesidad de realizar un proceso digestivo altamente eficaz, este modelo implicaría entonces que con poca disponibilidad de alimento o con baja disponibilidad de ciertos nutrientes que estén por encima del nivel de desnutrición, se presentarían altos contenidos enzimáticos. Esto podría explicar porque las larvas de herbívoros y omnívoros en peneidos como protozoas o mysis presentan mayor contenido de proteasas en comparación con las

carnívoras en carídeos u homaridos (Harris *et al.* 1986; Harms *et al.* 1991; Jones *et al.* 1997b).

El hecho de que la mayoría de células epiteliales del tracto digestivo en larvas de libre nado sean absorbentes, indican que la secreción de enzimas digestivas puede ser limitada en estos estadios tempranos. Por este motivo se presenta una relación directa entre la presencia/ausencia de alimento y su composición, con la actividad y con la concentración de enzimas digestivas. Bajo este contexto el análisis de la actividad enzimática digestiva es una herramienta que permite entender la fisiología digestiva y determinar las características nutricionales de un organismo (De Silva y Anderson, 1995; Andrés *et al.* 2010; Mireia *et al.* 2010). Los estudios de nutrición de las larvas de los crustáceos con los métodos tradicionales, indican que ésta parece depender de pocas enzimas digestivas, las cuales presentan altos niveles de actividad, en comparación con los adultos (Jones *et al.* 1997a, 1997b). Las larvas omnívoras presentan grandes variaciones en los niveles de proteasas, las cuales dependen de la composición del alimento suministrado. Algunas larvas de peneidos y cangrejos, reducen sus niveles de proteasas cuando son alimentadas con zooplancton altamente proteico, en comparación con aquellas que se alimentan con una dieta baja en proteínas (Jones *et al.* 1993; Rodríguez *et al.* 1994). Otras especies de peneidos incrementan sus niveles de tripsina en los estadios herbívoros de protozoas, alcanzando un pico al acercarse la transición de mysis y declinando al volverse carnívoros (Lovett y Felder, 1990; Jones y Kamarundi, 1993).

Mecanismos regulatorios de la expresión de genes y la producción de enzimas en larvas de crustáceos

El estudio de la biología molecular ha abierto diversos campos de investigación, como resultado se han desprendido múltiples ramas de estudio, entre ellos la transcriptómica. En las células, la información genética cifrada en el ADN y contenida en los genes se expresa a través de los mecanismos de transcripción y traducción, a partir del cual se producen moléculas de ARN mensajero (ARNm) y proteínas. El transcriptoma es el conjunto de todos los transcritos de ARN que se pueden generar en un momento y bajo una condición fisiológica determinada a partir del genoma de un organismo, estos están involucrados en

diversas funciones celulares, directamente como moléculas biológicas activas de ARN, o indirectamente a través de las proteínas que codifican los ARNm (Bolívar-Zapata, 2007; Soto & López, 2012).

Cualquier organismo marino en los estadios larvales experimenta cambios importantes a nivel celular y morfológico. Durante el periodo larval el desarrollo del tracto digestivo combina estos dos aspectos, en este proceso los mecanismos reguladores se presentan en diferentes niveles, y parecen estar genéticamente conectados, afectando los procesos de transcripción y traducción (Zambombino-Infante y Cahu, 2001; Muhlia-Almazán y García-Carreño, 2003). La cantidad de moléculas producidas de determinado ARNm depende de la función que este tenga en un proceso celular específico; así, cuando se requiere dar respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producen; de manera similar, bajo circunstancias particulares hay genes que permanecen apagados, pero bajo la ocurrencia de un estímulo particular, se expresan y se inicia la transcripción correspondiente.

Los mecanismos involucrados con el lugar, el cómo y el cuándo se genera un transcrito, son fundamentales para el entendimiento de la actividad biológica de un gen; más aún, los niveles de ARNm pueden dar una visión clara de patrones de expresión, pero además permiten realizar cuantificaciones altamente correlacionadas entre la abundancia de ARNm y la abundancia de proteínas (Lockhart & Winzeler, 2000).

La interpretación de la expresión génica requiere disponer de información del genoma del ADN y los ARN expresados, los cuales se han desarrollado en muy pocas especies de importancia acuícola, los más estudiados son los peces (Rodrigues *et al.* 2012). El control genético en la síntesis de enzimas puede conducir a: 1) Cambios en la cantidad de una enzima producida, 2) Expresión de diferentes enzimas dentro de una célula, o 3) Cambios en la abundancia relativa de enzimas que catalizan una reacción. La mayoría de los organismos sintetizan diferentes enzimas llamadas isoformas o isoenzimas que catalizan una sola reacción y son codificadas por diferentes genes (Hochachka y Somero, 1984; Resch-Sedlmeier y Sedlmeier, 1999; Forne *et al.* 2010).

En la década de los noventa se desarrollaron diferentes métodos para la detección y cuantificación de ARNm a partir de muestras biológicas como el *Northern blotting*, RT-PCR (del Inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), microarreglos de

ADNc (ADN complementario obtenido por transcriptasa inversa a partir de ARNm), los cDNA-AFLP (del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*) y el análisis serial de expresión de genes SAGE (del inglés *Serial Analysis of Gene Expression*), entre otras técnicas. Estos procedimientos permitieron generar conocimiento en transcriptómica, al estudiar la expresión de genes bajo estímulos particulares, también fue posible determinar cambios en los patrones de expresión génica en diferentes tratamientos y conocer las cinéticas de expresión (Shalon *et al.* 1996; Schena *et al.* 1998; Ferrer *et al.* 2004; Meyers *et al.* 2004; Valdés *et al.* 2013). Sin embargo, estas técnicas enmascaran la detección de transcritos de baja abundancia, por tener baja cobertura (Ward *et al.* 2012).

En estudios relacionados en larvas de peces marinos se ha descrito el desarrollo del sistema digestivo y la formación de órganos mediante histología, detallando la dinámica de las principales enzimas digestivas y la expresión de genes en diferentes tipos de tripsinas, pepsinas y quimiotripsinas (proteasas), amilasas, leucina y quitinasas (carbohidrasas) y algunas lipasas y enterasas. Los experimentos se han enfocado a etapas finales larvales o al inicio de la juvenil, para investigar la fase de destete en especies como corvina (*Larimichthys crocea*) mero (*Labrus bergylta*), lubina (*Lates calcarifer*), dorada (*Sparus aurata*) bacalao (*Gadus morhua*), lenguado (*Solea solea*) y pez globo (*Sphoeroides annulatus*); en general los estudios indican que existen cambios a lo largo del desarrollo larval, los cuales ocurren como respuesta a los tipos de dietas suministradas o bien a los períodos de ayuno (Zambombino-Infante y Cahu, 2001; García-Gasca *et al.* 2006; Kortner *et al.* 2011; Parma *et al.* 2013; Srichanun *et al.* 2013; Truls-Wergeland *et al.* 2013; Cai *et al.* 2015; Mata-Sotres *et al.* 2016; Canada *et al.* 2017).

En crustáceos se han reportado muy pocos trabajos relacionados con el tema. Estudios con larvas de *Litopenaeus schmitti* bajo un solo esquema de alimentación se realizaron para determinar las variaciones en la concentración de las endopeptidasas tripsina y quimotripsina y su relación con concentraciones de ARN y ADN (Chomczynski y Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993; Green y Sambrook, 2012), encontrando que ambos contenidos se reducen desde el huevo a protozoa III, incrementando paulatinamente hasta poslarva IV. La variación en la actividad enzimática también se relaciona con diferentes estrategias para el uso de la energía a lo largo del desarrollo larvario. La elevada actividad enzimática combinada con un incremento del ARN/ADN en los estadios de protozoa, denotan que en

este periodo es necesario suministrar una dieta con alto contenido energético, que permita al organismo acumular reservas para el posterior crecimiento (Lemos *et al.* 2002).

Actualmente los avances en las técnicas de secuenciación del ADN, a través de tecnologías de nueva generación, NGS (del inglés *Next Generation Sequencing*), permiten caracterizar y analizar toda la expresión génica de una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, esto es posible a través de la implementación de la secuenciación de ADNc, o más recientemente de la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como RNA-seq, la cual cuenta con plataformas abiertas dirigidas a secuenciaciones directas de bibliotecas de ácidos nucleicos con un alto rendimiento. Las plataformas más usadas actualmente son de la compañía *Illumina* siendo la maquina HiSeq la preferida por su rendimiento y costos. Estas herramientas han cambiado la forma de analizar y comprender los transcriptomas. La información generada, una vez integrada e interpretada permite vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de co-expresión. Independientemente de la plataforma escogida para la secuenciación los procesos comparten varias etapas comunes (Wang *et al.* 2009; Garber *et al.* 2011; Sánchez-Pla *et al.* 2012; Soto y López, 2012; Ward *et al.* 2012; Valdés *et al.* 2013; Capobianco, 2014) entre las que destacan:

1. Preparación de las bibliotecas que involucran la fragmentación de las moléculas de ARN, síntesis de ADNc y ligamiento de adaptadores específicos a ambos extremos de la cadena.
2. Amplificación por clonación de cada molde, ya que la mayoría de sistemas de imágenes no han sido diseñados para detectar eventos fluorescentes individuales.
3. Unión de los ADN moldes amplificados a un soporte sólido, ya sea en una celda de flujo o una cámara de reacción.
4. Flujo continuo y sincronizado, así como lavado de reactivos para la extensión de las hebras de ADN, mientras que las señales son obtenidas por el sistema de detección.
5. Luego de obtenida la señal, la imagen cruda de datos conseguida debe convertirse en lecturas cortas (secuencia de nucleótidos generada por los ADN modelos) por un proceso conocido en inglés como *base-calling*, dependiendo de la plataforma la extensión o síntesis de ADN puede obtenerse enzimáticamente por polimerización.

Las aplicaciones de este tipo de metodologías en el campo de los alimentos y la nutrición son relativamente nuevas, en comparación a sus aplicaciones a las ciencias básicas, y como ya se comentó las investigaciones enfocadas a la nutrición de larvas de crustáceos, son incipientes. Solo recientemente se reportó un estudio en larvas de *Litopenaeus vannamei* durante cinco estadios larvales: embriones, nauplios, zoeas, mysis y poslarvas aplicando la tecnología RNA-seq, secuenciando las librerías obtenidas usando Illumina HiSeq™ 2000 (Wei *et al.* 2014). Las lecturas de cada estadio se ensamblaron en unigenes, los cuales se obtienen mediante programas especializados que realizan el agrupamiento de secuencias relacionadas, posteriormente los unigenes obtenidos de los cinco estadios fueron unidos, analizados y mapeados con ayuda de programas bioinformáticos especializados, realizando alineamientos e identificando los genes por blast (Altschul *et al.* 1990; Pertea *et al.* 2003; Grabherr *et al.* 2011). El agrupamiento de genes (*gene clustering*), permite asociar aquellos que tienen perfiles de expresión similares, esto es útil para descubrir genes que se co-regulan y que pueden participar en procesos biológicos similares, o bien posibilita la reducción en la dimensionalidad de los datos (Valdés *et al.* 2013).

Continuando con el estudio de Wei *et al.* (2014), entre los 66815 unigenes que se obtuvieron, 296 correspondieron a 16 tipos de enzimas digestivas diferentes, incluyendo cinco carbohidrasas, siete peptidasas y cuatro lipasas las cuales han sido descritas con anterioridad para camarones adultos o juveniles de la misma especie, así como en *L. vannamei* y *P. monodon* (Klein *et al.* 1998; Sellos y van Wormhoudt, 1999; Le Chevalier *et al.* 2000; Muhlia-Almazán *et al.* 2003; Van Wormhoudt y Sellos, 2003; Zhao *et al.* 2007; Huang *et al.* 2010; Proespraiwong *et al.* 2010; Rivera-Perez *et al.* 2011).

Con este tipo de estudios se elucidan los caminos metabólicos relacionados con la ingestión y absorción del alimento, pudiendo clasificar cientos de genes dentro de estas vías, no solo las enzimas digestivas. Esto es posible mediante un proceso de mapeo de genes con las bases disponibles en la web, conocido como Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG (Tabla 1).

Una forma clara de visualizar los patrones de actividad de las enzimas digestivas (α -amilasa, es a través mapas térmicos, en los cuales se observa como los unigenes expresados incrementan gradualmente a lo largo del desarrollo larval. Wei *et al.* (2014) muestran en su

estudio un ejemplo del potencial de éstas herramientas. Este tipo de estudios pueden revelar la diversidad y la dinámica de las enzimas digestivas durante el desarrollo larval, además proveen un soporte para entender mejor los cambios fisiológicos durante la transición de la dieta de acuerdo a su desarrollo.

Tabla 1. Rutas metabólicas y conteo de unigenes KEGG relacionados con la ingestión y absorción (Tomado de: Wei *et al.* 2014).

Rutas metabólicas	Conteo de unigenes
Secreciones salivales	572
Digestión y absorción de proteínas	519
Secreciones pancreáticas	443
Metabolismo de azúcares de nucleótidos y aminoazúcares	214
Metabolismo de glicerolípidos	170
Metabolismo de almidón y sacarosa	143
Digestión y absorción de lípidos	114
Metabolismo de manosa y fructosa	114
Metabolismo de galactosa	106
Metabolismo de ácidos grasos	99

El objetivo clave de la transcriptómica es preciso y consiste en caracterizar todo el transcriptoma abarcando cualquier tipo de transcripción incluyendo el ARNm y ARN no codificantes, determinar la estructura de la transcripción de genes, por ejemplo, sitios de inicio 5' y finales 3' y variantes de empalme y la cuantificación de los niveles de expresión diferencial de cada transcripción bajo diferentes condiciones (Valdés *et al.* 2013).

Conclusión

Este tipo de investigaciones trazan el camino inicial hacia el entendimiento profundo de la nutrición con aplicación en el cultivo de crustáceos, usando como herramienta básica la biología molecular y la expresión de los genes ante los factores medioambientales, o ante las variaciones de las dietas. Los procesos de transcripción acoplados a otras ramas

moleculares como la proteómica, metabolómica y bioinformática, podrán en conjunto ayudar a entender y plantear estrategias nutricionales efectivas, las cuales contribuirán a mejorar los índices de supervivencia y de crecimiento en larvas de crustáceos de interés comercial.

Referencias

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, y D.J. Lipman., 1990. Basic local alignment search tool. *Jour. Mol. Biol.*, 215: 403–410.
- Andrés, M., E. Gisbert, M. Díaz, F.J. Moyano, A. Estévez y G. Rotllant. 2010. Ontogenetic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *Jour. of Exp. Mar. Bio. and Eco.*, 389: 75–84.
- Biesiot, P.M., y J.M. Capuzzo. 1990. Changes in digestive enzyme activities during early development of the American lobster *Homarus americanus* Milne edwards. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 136: 107–122.
- Bolívar-Zapata, F.G. 2007. Capítulo III: Ciencia genómica, proteómica y bioinformática el genoma, el transcriptoma y el proteoma humano 85-116 pp. En: Bolívar-Zapata, F.G (Ed.). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Segunda edición. El Colegio Nacional, México. 736 p.
- Brun, G.L. y M.B. Wojtowicz. 1976. A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of the Jonah crab (*Cancer borealis*) and the rock crab (*Cancer irroratus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 53B, 387-39.
- Cai, Z. Li, W., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., y Q. Ai. 2015. Effects of dietary size-fractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. *Aquaculture*, 440: 40–47.
- Canada, P., Conceição, L.E.C., Mira, S., Teodósio, R., Fernandes, J.M.O., Barrios, C., Millán, F., Pedroche, J., Valente, L.M.P., y S. Engrola. 2017. Dietary protein complexity modulates growth, protein utilisation and the expression of protein digestion-related genes in *Senegalese sole* larvae. *Aquaculture*, *in press*.
- Capobianco, E. 2014. RNA-Seq data: a complexity journey *Comp. and Struc. Biotech. Jour.*, 11: 123–130.
- Castellanos, L., L.J. González, y G. Padrón. 2004. Proteómica. 365-403. En: Vispo, N.S. (Ed.). *Combinatoria Molecular. Elfos Scientiae*. La Habana, Cuba. 419 p.
- Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio.Tech.*, 15: 532–537.
- Chomczynski, P., y N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Bioch.*, 162: 156- 159.
- De Silva, S.S., y T.A. Anderson. 1995. *Fish nutrition in aquaculture*. Chapman y Hall Aquaculture Series. London, UK. 319 p.
- Felgenhauer, A., B. Thistle, y L. Watling. 1989. *Functional Morphology of Feeding and Grooming in Crustacea*. CRC Press. Rotterdam, Netherlands. 320 p.
- Ferrer, A., M. Nazabal, y L.I. Novoa. 2004. Una aproximación a la genómica. 323-345. En: Vispo, N.S. (Ed.). *Combinatoria Molecular. Elfos Scientiae*. La Habana, Cuba. 419 p.

- Forne, I., J. Abián., y J. Cerda. 2010. Fish proteome analysis: Model organisms and non-sequenced species. *Proteomics*, 10: 858-872.
- Garber, M., M. Grabherr, M. Guttman, y C. Trapnell. 2011. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNAseq. *Nat. Meth.*, 8: 469-478.
- García-Gasca, A., M.A. Galaviz, J.N. Gutiérrez, y A. García-Ortega. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*, 251: 366–376.
- Grabherr, M.G., B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q.D. Zeng, Z.H. Chen, E. Mauceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B.W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, y A. Regev. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biot.*, 29: 644–652.
- Green, M.R., y J. Sambrook. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 1881 p.
- Harms, J., B. Meyer-Harms, R.R. Dawirs, y K. Anger. 1994. Growth and physiology of *Carcinus maenas* (Decapoda, Portunidae) larvae in the field and in laboratory experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 108: 107–118.
- Harms, J., K. Anger, S. Klaus, y B. Seeger. 1991. Nutritional effects of ingestion rate, digestive activity, growth and biochemical composition of *Hyas araneus* L. (Decapoda: Majidae). *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 233-265.
- Harris, R.P., J.F. Samain, J. Moal, V. Martin-Jezequel, y S.A. Poulet. 1986. Effects of algal diet on digestive activity in *Calanus helgolandicus*. *Mar. Biol.* 90: 353-361.
- Hirche, H.J., y K. Anger. 1987. Digestive enzyme activities during larval development of *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, 87 (2): 297–302.
- Hochachka, P., y G. Somero. 1984. *Biochemical adaptation*. Princeton University Press. USA, 537 p.
- Houlihan, D., T. Boujard, y M. Jobling. 2001. *Food intake in fish*. Blackwell Science Ltda. Londres, UK. 418 p.
- Huang, Q.S., J.H. Yan, J.Y. Tang, Y.M. Tao, X.L. Xie, Y. Wang, X.Q. Wei, Q.H. Yan, y Q.X. Chen. 2010. Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 75-81.
- Jones, D.A., A.B. Yule y D.L. Holland. 1997a. Larval nutrition 353-389. En: D’Abramo, L.R., D.E. Conklin y D.M. Akiyama (Eds.). *Crustacean nutrition: Advances in World Aquaculture*. Volume 6. World Aquaculture Society, Louisiana, USA. 587 p.
- Jones, D.A., M. Kumlu, L. Le Vay, y D.J. Fletcher. 1997b. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: A review. *Aquaculture*, 155: 285-295.
- Jones, D.A., M.S. Kamarudin, y L. Le Vay. 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. *Jour. World Aquacult. Soc.*, 24: 199-210.

- Kamarudin, M.S., D.A. Jones, L. Le Vay, y A.Z. Abidin. 1994. Ontogenetic changes in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 123: 323–333.
- Klein, B., D. Sellos, y A. van Wormhoudt. 1998. Genomic organization and polymorphism of a crustacean trypsin multi-gene family. *Gene*, 216 (1): 123–129.
- Kortner, T.M., I. Overrein, G. Øie, E. Kjørsvik, T. Bardal, P.A. Wold, y A. Arukwe. 2011. Molecular ontogenesis of digestive capability and associated endocrine control in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Com. Bioch. and Phys., Part A*, 160: 190–199.
- Le Chevalier, P., D. Sellos, y A. van Wormhoudt. 2000. Molecular cloning of a cDNA encoding alpha-glucosidase in the digestive gland of the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1135–1143.
- Lemos, D., F.L. Garcia-Carreño, P. Hernández, y A. Navarrete del Toro. 2002. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity, RNA and DNA content of larval and postlarval white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Aquaculture*, 214: 363–380.
- Le Vay, L., D.A. Jones, A.C. Puello-Cruz, R.S. Sangha y C. Ngamphongsai. 2001. Digestion in relation to feeding strategies exhibited by crustacean larvae. *Com. Bioch. Phys. Part A*, 128: 623-630.
- Lockhart, D., y E. Winzeler. 2000. Genomics, Gene Expression and DNA Arrays. *Nature*, 415 : 827-836.
- Lovett, D.L., y D.L. Felder. 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.*, 178: 144–159.
- Mata-Sotres, J.A., Martos-Sitcha, J.A., Astola, A., Yúfera, M., y G. Martínez-Rodríguez. 2016. Cloning and molecular ontogeny of digestive enzymes in fed and food-deprived developing gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Com. Bio. Phy. Part B: Bioch. and Mol. Biol.*, 191: 53–65.
- Meyers, B., D. Galbraith, T. Nelson, y V. Agrawal. 2004. Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate, *Plant Physiology*, 135: 637-652.
- Mireia, A., E. Gisbert, M. Díaz, F.J. Moyano, A. Estévez y G. Rotllant. 2010. Ontogenetic changes in digestive enzymatic capacities of the spider crab, *Maja brachydactyla* (Decapoda: Majidae). *Jour. of Exp. Mar. Bio. and Eco.*, 389: 75–84.
- Muhlia-Almazán, A., y F.L. García-Carreño. 2003. Digestion physiology and proteolytic enzymes of crustacean species of the Mexican Pacific Ocean. *Cont. Stu. Eas. Pac. Crus.*, 32: 77-91.
- Parma, L., Bonaldo, A., Massi, P., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., y P.P. Gatta. 2013. Different early weaning protocols in common sole (*Solea solea* L.) larvae: Implications on the performances and molecular ontogeny of digestive enzyme precursors. *Aquaculture*, 414–415: 26–35.
- Pertea, G., X.Q. Huang, F. Liang, V. Antonescu, R. Sultana, S. Karamycheva, Y. Lee, J. White, F. Cheung, B. Parvizi, J. Tsai, y J. Quackenbush. 2003. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): A software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics*, 19: 651–652.
- Proespraiwong, P., A. Tassanakajon, y V. Rimphanitchayakit. 2010. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: phylogenetics, expression and activities. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 156: 86–96.

- Resch-Sedlmeier, G., y D. Sedlmeier. 1999. Release of digestive enzymes from the crustacean hepatopancreas: effect of vertebrate gastrointestinal hormones. *Com. Bioch. And Phys. B.*, 123: 187-192.
- Rivera-Perez, C., F.L. Garcia-Carreno, y R. Saborowski. 2011. Purification and biochemical characterization of digestive lipase in whiteleg shrimp. *Mar. Biotech.*, 13: 284–295.
- Rodrigues, P.M., T.S. Silva, J. Dias, y F. Jessen. 2012. Proteomics in aquaculture: Applications and trends. *Jour. Prot.*, 75: 4325-4345.
- Rodríguez, A., L. Le Vay, G. Mourente, y D.A. Jones. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* (Bate), during herbivorous and carnivorous feeding. *Mar. Biol.*, 118: 45-53.
- Rotllant, G., F.J. Moyano, M. Andrés, M. Díaz, A. Estévez y E. Gisbert. 2008. Evaluation of fluorogenic substrates in the assessment of digestive enzymes in a decapod crustacean *Maja brachydactyla* larvae. *Aquaculture*, 282: 90–96.
- Saborowski, R., S. Thatje, J.A. Calcagno, G.A. Lovrich, y K. Anger. 2006. Digestive enzymes in the ontogenetic stages of the southern king crab, *Lithodes santolla*. *Mar. Biol.*, 149: 865–873.
- Sather, B. T. 1969. A comparative study of amylases and proteinases in some Decapod Crustacea. *Comp. Bioch. Phys.*, 28: 371-379.
- Sánchez-Pla, A., F. Reverter, M.C. Ruíz de Villa, y M. Comabella. 2012. Transcriptomics: mRNA and alternative splicing. *Journal of Neuroimmunology*, 248: 23-31.
- Schena, M., R. Heller, T. Theriault, K. Konrad,; E. Lachenmeier, y R. Davis. 1998. Microarrays: Biotechnology's discovery platform for functional genomics, *Trends Biotechnology*, 16: 301-306.
- Sellos, D., y A. van Wormhoudt. 1999. Polymorphism and evolution of collagenolytic serine protease genes in crustaceans. *Bioch. Biophys. Acta Prot. Struct. Mol. Enzymol.*, 1432 (2): 419–424.
- Shalon, D., S. Smith, y P. Brown. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization, *Genome Research*, 6: 639-645.
- Soto, J.C. y C.E. López. 2012. RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16 (2): 101-113.
- Srichanun, M., C. Tantikitti, P. Utarabhand, y T.M. Kortner. 2013. Gene expression and activity of digestive enzymes during the larval development of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Comp. Bioch. and Phys.*, Part B, 165: 1–9.
- Truls-Wergeland, H., A. Folkvord, E. Grøtan, y Ø. Sæle. 2013. Genetic ontogeny of pancreatic enzymes in *Labrus bergylta* larvae and the effect of feed type on enzyme activities and gene expression *Comp. Bioch. and Phys.*, Part B, 164: 176–184.
- Valdés, A., C. Ibáñez, C. Simó, y V. García-Cañas. 2013. Recent transcriptomics advances and emerging applications in food science. *Trends in Analytical Chemistry*, 52: 142–154.
- Van Wormhoudt, A., y D. Sellos. 2003. Highly variable polymorphism of the alpha-amylase gene family in *Litopenaeus vannamei* (Crustacea decapoda). *Jour. Mol. Evol.*, 57: 659–671.

- Wang, Z., M. Gerstein, y M. Snyder. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev.Gen.*, 10: 57-63.
- Ward, J., L. Ponnala, y C. Weber. 2012. Strategies for transcriptome analysis in non-model plants, *Ame. Jou. Bot.*, 99 (2): 267-276.
- Wei, J., X. Zhang, Y. Yua, F. Li, y J. Xiang. 2014. RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Com. Bioch. and Phys., Part D* (11): 37–44.
- Zambombino-Infante, J. L y C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Com. Bioch. Phys. Part C*, 130: 477-487.
- Zhao, Z.Y., Z.X. Yin, S.P. Weng, H.J. Guan, S.D. Li, K. Xing, S.M. Chan, y J.G. He. 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish Shellfish Immunology*, 22: 520–534.