



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**INFLUENCIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS ALTAMENTE INSATURADOS (HUFA)
SOBRE EL SISTEMA DE DEFENSA Y LA SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRÉS
EN CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI***

TESIS

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

present a

Laurence Stéphanie Mercier

La Paz, Baja California Sur, octubre de 2007

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 10 del Mes de Septiembre del 2007, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Influencia de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) sobre el sistema de defensa y la susceptibilidad al estrés en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*"

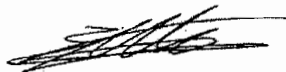
Presentada por la alumna:

Laurence Stéphanie MERCIER

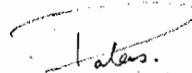
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura**

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

LA COMISION REVISORA



Ilie S. Racotta Dimitrov
CO-DIRECTOR DE TESIS



Elena Palacios Mechetnov
CO-DIRECTORA DE TESIS



Roberto Civera Cerecedo
CO-TUTOR



Ángel Isidro Campa Córdova
CO-TUTOR



Gloria Yepiz-Plascencia
CO-TUTORA



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial y comité revisor de tesis

Dra. Elena Palacios Metchenov
Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov
Dra. Gloria Yepiz-Plascencia
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. Roberto Civera Cerecedo

Jurado de examen

Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov
Dra. Gloria Yepiz-Plascencia
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dr. Roberto Civera Cerecedo
Dr. Dariel Tovar Ramírez

Suplente: Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

A mes parents et grands-parents,

AGRADECIMIENTOS

Siempre he sentido mucho placer al momento de escribir la sección de agradecimientos de un documento. Creo que además de la satisfacción personal de terminar un trabajo, me hace recordar los momentos y las personas que enriquecen mi Vida.

Este documento es la presentación final de mi trabajo de doctorado que empezó hace seis años con la búsqueda de apoyos económicos, y que pasó por diferentes etapas como son: la familiarización de un nuevo sistema, idioma y manera de trabajar; un cambio de proyecto y de director; el aprendizaje de manejar camarones y técnicas de análisis de laboratorio; muestreos intensos y estresantes; la participación en dos congresos; una estancia en el CIAD de Hermosillo y un reconocimiento en la última semana de posgrado. Tengo, hoy, mucho gusto de haber logrado la realización de esta investigación y quiero agradecer las siguientes personas por su contribución al desempeño de este trabajo:

- La Secretaría de Relaciones Exteriores en México y el “Ministère des Affaires Étrangères” en Francia quienes me otorgaron una beca bilateral de febrero 2003 a febrero 2006.
- El Rotary Club de Normandie (district 1640) y de Coutances quienes me brindaron un apoyo económico. Quiero particularmente agradecer a Marcel Queinnec quien mostró un gran interés por apoyarme en mi plan de estudiar un doctorado en México.
- El banco Santander por la beca de movilidad que me otorgaron para poder realizar mi estancia en Hermosillo.
- El CONACyT por el financiamiento del proyecto (#43249) al cual pertenecía.
- Al programa de mejoramiento genético del CIBNOR por la donación de dos lotes de postlarvas.
- El posgrado del CIBNOR por su apoyo para asistir a un congreso.
- A Elena Palacios e Ilie Racotta quienes me rescataron de una situación peligrosa y me asesoraron en este trabajo. Quiero agradecerles por la rapidez de sus correcciones, su gran disponibilidad, la calidad de sus comentarios, las ideas del proyecto, el dinamismo que tienen, y el apoyo que me brindaron para asistir a congresos. También quiero agradecerles por haber financiado el pago de mi examen de grado.
- A mi comité tutorial, en particular a Gloria Yepiz-Plascencia quien me recibió en su laboratorio y que tuvo muchas atenciones. A Ángel Campa por haberme enseñado técnicas de análisis inmunológicos y a Roberto Civera por sus consejos para la elaboración de las dietas experimentales.
- A mis compañeros de laboratorio: Lula, Atzin, Mónica, Miguel, Verónica, Apolinar y Rosy.
- A mis dos asistentes de verano científico: Magda y Anabel.
- A los técnicos: Olivia, Marcos, Roberto, Víctor, Carmen, Polo, Chula y Basilio.
- A Adriana Mulia-Almazán, Ana Maria Calderón de la Barca, Ira, Guillermo Portillo, Ernesto Goytortúa y Fernando de la empresa “Acuacultores de la Península de Baja California”, les agradezco su tiempo y sus consejos.
- A mis amigos: Martha, Silvie, Oliviert, Ana Maria, Claudia, Célia y Claude, Miguel y Marlenne, Maya y Ángel.
- A mi familia: los miembros Mercier-Mauger y Hernández-Moreno.

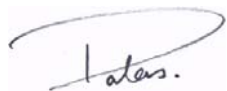
RESUMEN

Las enfermedades son consideradas hoy en día como uno de los principales agentes que afectan a la industria camaronícola. Muchas de estas enfermedades se relacionan con un decremento de la defensa inmune, lo cual puede ser provocado por una condición de estrés. Una alternativa para disminuir estas enfermedades es utilizar ácidos grasos altamente insaturados (en inglés, Highly Unsaturated Fatty Acids, HUFA) por sus funciones moduladoras en la respuesta inmune. El objetivo del presente trabajo fue evaluar las respuestas metabólicas e inmunes en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* sometido a una condición de estrés crónico de manipulación y determinar si los HUFA tienen una influencia sobre estas dos respuestas. Se realizaron tres experimentos: en el primero, camarones cultivados en tanques de concreto al exterior o tanques de plástico al interior fueron sometidos diariamente a un estrés inducido por manipulación durante cuatro semanas. Las respuestas metabólicas (concentraciones en glucosa, lactato, proteínas totales, colesterol, triacilglicéridos, lípidos totales, hemocianina y carotenoides) e inmunes (conteo total de hemocitos, producción de anión superóxido y actividad de la superóxido dismutasa) fueron medidas al final del periodo experimental y comparadas con las de camarones de un grupo control. En los tanques de concreto, los camarones estresados mostraron concentraciones significativamente menores de proteínas totales, triacilglicéridos, lípidos totales en hemolinfa y de carbohidratos en músculo. En los tanques de plástico, los camarones estresados tuvieron una mayor concentración de glucosa en la hemolinfa y de lípidos totales en el hepatopáncreas, pero la concentración de carbohidratos en el hepatopáncreas fue significativamente menor. Para los camarones de los dos sistemas experimentales (control y estrés) no se observaron diferencias significativas en la respuesta inmune, sugiriendo que el estrés crónico no afectó la capacidad de defensa de los camarones, con excepción de una disminución de los niveles de proteína total en hemolinfa. Menores alteraciones para los camarones de control en los tanques de concreto, así como la presencia de alimento natural en este sistema pueden explicar en parte las diferencias en los resultados de la respuesta metabólica. En el segundo experimento, los camarones fueron alimentados con una dieta baja, media o alta en HUFA (0.1, 1.0 y 1.8%) durante 24 días. Al final del periodo experimental, se midieron variables inmunes y se determinó la composición en ácidos grasos del músculo de los camarones. Los camarones alimentados con las dietas media y alta en HUFA mostraron un peso final significativamente mayor del peso inicial y la ocurrencia de mudas fue mayor en aquellos alimentados con la dieta media en HUFA. No se encontraron diferencias significativas en las variables inmunes medidas, con excepción de la concentración en HDL-BGBP (en inglés, High Density Lipoprotein-Beta Glucan Binding Protein) que resultó significativamente mayor en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA. En el músculo, un incremento de la proporción de HUFA en los lípidos neutros y polares fue observado con el aumento de nivel de los HUFA en las dietas. En el tercer experimento, dos dietas conteniendo un nivel bajo y alto en HUFA (0.1% y 2.1%) fueron administradas durante 38 días a dos grupos de camarones. En la primera serie experimental, los camarones fueron sometidos diariamente a una condición de estrés crónico durante 30 días. Al final del experimento se midieron las variables metabólicas e inmunes. En la segunda

serie experimental, el mismo estímulo estresor fue aplicado solamente de manera aguda al final del periodo experimental y se midieron las variables metabólicas e inmunes 1 y 24 horas después de aplicar el estímulo estresor. Ambas series experimentales, tenían controles alimentados con cada dieta. Los camarones que fueron estresados durante 30 días tuvieron una supervivencia, peso final y consumo de alimento significativamente menor. Dentro de las variables inmunes medidas, solamente la concentración de la HDL-BGBP fue significativamente afectada, con niveles más altos en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA. La composición en ácidos grasos de los lípidos neutros y polares en hemocitos fue influenciada por las dietas y la proporción de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) en los lípidos polares fue más alta en los camarones estresados y alimentados con la dieta baja en HUFA comparado con los de control. En la hemolinfa se obtuvo un incremento significativo en la concentración de glucosa en los camarones estresados, independientemente de la dieta. El nivel de lactato fue significativamente menor en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA. Los camarones sometidos a un estrés agudo presentaron diferencias significativas en su respuesta inmune. El conteo total de hemocitos aumentó una hora después del estímulo, particularmente en los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA. La capacidad de los hemocitos para producir anión superóxido incrementó una hora después de haber aplicado el estímulo, solamente en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA. Las concentraciones en lactato y glucosa incrementaron una hora después del estímulo y regresaron a niveles similares a los de los animales de control después de 24 horas. En conclusión, el estrés crónico tuvo un efecto negativo principalmente en el desempeño biológico de los camarones, mientras que el estrés agudo tuvo un efecto más pronunciado en las respuestas metabólicas e inmunes. El enriquecimiento de las dietas con HUFA tuvo un papel benéfico sobre la tolerancia al estrés de manipulación, en parte observado en la supervivencia durante el cultivo y posiblemente en la capacidad de la respuesta inmune.

Palabras claves: Estrés, HDL-BGBP, HUFA, *Litopenaeus vannamei*, Sistema Inmune

Vo. Bo.



Dra. Elena Palacios Mechetnov
Co-directora



Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov
Co-director

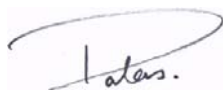
ABSTRACT

Diseases are considered nowadays one of the main problems affecting the shrimp industry. Many diseases are associated to a decrease in the immune defense system, which can be produced by stress. One alternative to reduce these diseases is the use of highly unsaturated fatty acids (HUFA) because they modulate the immune response. The aim of this work was to evaluate the metabolic and immune responses in the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* subjected to a handling chronic stress and determine if HUFA influence these responses. Three experiments were performed: in the first one, shrimp raised in outdoor concrete tanks or indoor plastic tanks were submitted to a repeated stress induced by daily handling for four weeks. Metabolic responses (glucose, lactate, total protein, cholesterol, triacylglyceride, total lipid, hemocyanin, and carotenoid content) and immune responses (total hemocyte count, superoxide anion production, and superoxide dismutase activity) were measured at the end of the experimental period and compared to control shrimp. Stressed shrimp from concrete tanks had significantly lower concentrations of total proteins, triacylglycerides, and total lipids in hemolymph and a significantly lower concentration of carbohydrates in muscle. Stressed shrimp from plastic tanks showed higher concentrations of glucose in hemolymph and higher concentrations of total lipids, but lower concentrations of carbohydrates in hepatopancreas. Immune responses were not significantly different between stressed and control shrimp raised in either tank system, suggesting that chronic stress does not depress immune response capacity, with the exception of lower levels of total proteins in hemolymph. Lower amounts of disturbance occurring in outdoor control shrimp, as well as natural food availability in outdoor tanks could partly explain differences in the metabolic responses. In a second experiment, shrimp were fed a low, medium, or high-HUFA diet (0.1, 1.0, and 1.8%) for 24 days. At the end of the experiment, immune variables and the composition of fatty acids in muscle were determined. A significant difference between initial and final weight occurred in shrimp fed either the medium-HUFA or high-HUFA diet. The number of total molts was significantly higher in shrimp fed the medium-HUFA diet. The high density lipoprotein-beta glucan binding protein (HDL-BGBP) concentration was significantly higher in shrimp fed the high-HUFA diet, but no other significant differences were observed in the immune variables. The proportion of HUFA in muscle increased with the increased content of HUFA in diets. In the third experiment, two diets containing a low or high level of HUFA (0.1% and 2.1%) were administered for 38 days to two groups of shrimp. In one group, handling stress was applied daily for 30 days and metabolic and immune variables were measured at the end. In the other group, handling stress was applied only once, and metabolic and immune variables were determined 1 and 24 hours after the stressor event. In both groups, controls were unstressed shrimp fed the same diets. Shrimp that were stressed daily for 30 days had significant reduced survival, final weight, and consumption of feed. Among the immune variables measured, only the concentration of the HDL-BGBP was significantly affected, with higher levels in shrimp fed the high-HUFA diet. General fatty acid composition of polar and neutral lipids in hemocytes was influenced by the diet. The proportion of EPA (20:5n-3) and DHA (22:6n-3) in polar lipids in hemocytes was higher in stressed shrimp fed the low-HUFA diet compared to controls. A significant

increase in glucose concentration in hemolymph occurred in stressed shrimp, regardless of diet. Lactate level in hemolymph was significantly lower in shrimp fed the high-HUFA diet. Shrimp submitted to the acute stress event showed significant differences in their immune response. Total hemocyte count rose one hour after the stressor event, especially for shrimp fed the low-HUFA diet. In contrast, superoxide anion production increased one hour after applying the stressor, but only in shrimp fed the high-HUFA diet. Lactate and glucose concentrations in hemolymph increased one hour after the stressor and returned to control levels after 24 hours. Thus, a negative effect of repeated handling stress was mainly observed in biological performance, whereas acute stress had a more pronounced effect on shrimp metabolic and immune responses. A beneficial role of enrichment with HUFA on tolerance to handling stress was partly observed on survival during culture and possibly on the immune response capacity.

Keywords: HDL-BGBP, HUFA, Immune System, *Litopenaeus vannamei*, Stress

Vo. Bo.



Dr. Elena Palacios Mechetnov
Co-director



Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov
Co-director

ÍNDICE

	Páginas
Introducción	1
Antecedentes	5
A.1. El camarón blanco del Pacífico	5
A.2. El estrés	6
A.3. Sistema inmune de los camarones peneidos	8
A.4. Ácidos grasos altamente insaturados	17
Justificación	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
Hipótesis de trabajo	28
Capítulo I Respuestas metabólicas e inmunes de <i>L. vannamei</i> cultivado en condiciones de estrés crónico	29
I. 1. Metodología	30
I. 1. 1. Diseño experimental	30
I. 1. 2. Dieta experimental	33
I. 1. 3. Estrés crónico de manipulación	34
I. 2. Muestreo de los camarones	36
I. 2. 1. Variables metabólicas	36
I. 2. 2. Variables inmunes	37
I. 3. Análisis de laboratorio	38
I. 3. 1. Análisis bioquímicos	38
I. 3. 2. Análisis de componentes del sistema de defensa	38
I. 4. Análisis estadísticos	39
I. 5. Resultados	40
I. 5. 1. Desempeño biológico	40
I. 5. 2. Variables metabólicas	44
I. 5. 3. Variables inmunes	47
I. 6. Discusión	50
I. 6. 1. Efecto del estrés sobre el desempeño de los camarones	50
I. 6. 2. Respuesta metabólica	50
I. 6. 3. Respuesta inmune	55
Capítulo II Respuesta inmune de <i>L. vannamei</i> alimentado con dietas que contienen diferentes concentraciones de HUFA	58
II. 1. Metodología	59
II. 1. 1. Dietas experimentales	59
II. 1. 2. Diseño experimental	60
II. 2. Muestreo de los camarones	61
II. 2. 1. Variables inmunes y composición de ácidos grasos en músculo	61
II. 3. Análisis de laboratorio	62

	Páginas
II. 3. 1. Análisis de componentes inmunes y de ácidos grasos	62
II. 4. Análisis estadísticos	63
II. 5. Resultados	63
II. 5. 1. Desempeño biológico	66
II. 5. 2. Variables inmunes	66
II. 5. 3. Composición de ácidos grasos en músculo	67
II. 6. Discusión	73
Capítulo III Respuesta metabólica e inmune de <i>L. vannamei</i> alimentado con dietas que contienen diferentes concentraciones de HUFA, y sometido a una condición de estrés crónico	76
III. 1. Metodología	77
III. 1. 1. Dietas experimentales	77
III. 1. 2. Diseño experimental	78
III. 2. Muestreo de los camarones	82
III. 2. 1. Variables metabólicas	82
III. 2. 2. Variables inmunes	83
III. 3. Análisis de laboratorio	85
III. 3. 1. Análisis bioquímicos	85
III. 3. 2. Análisis de componentes inmunes	86
III. 4. Análisis estadísticos	87
III. 5. Resultados	88
III. 5. 1. Estrés crónico	90
III. 5. 2. Estrés agudo	99
III. 6. Discusión	104
III. 6. 1. Desempeño general durante el experimento	104
III. 6. 2. Composición de ácidos grasos en los hemocitos	106
III. 6. 3. Efecto de los HUFA en la respuesta inmune	107
III. 6. 4. Efecto del estímulo estresor sobre la respuesta inmune	108
III. 6. 5. Respuesta metabólica	110
Discusión general	112
B. 1. Estrés crónico	112
B.2. Ácidos grasos altamente insaturados	114
Conclusiones	117
Referencias	119
Anexos	143

LISTA DE TABLAS

Tablas	Título	Páginas
Tabla I	Ubicación taxonómica del camarón blanco del Pacífico	5
Tabla II	Crecimiento y supervivencia en postlarvas de camarones peneidos después de ser alimentados con dietas enriquecidas en HUFA.	21
Tabla III	Crecimiento y supervivencia en juveniles de camarones peneidos después de ser alimentados con dietas enriquecidas en HUFA.	22
Tabla IV	Resistencia al estrés en camarones peneidos sometidos a diferentes estresores después de ser alimentados con dietas enriquecidas en HUFA.	23
Tabla V	Composición proximal y estabilidad en agua de la dieta experimental del capítulo I.	34
Tabla VI	Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables metabólicas en el capítulo I.	36
Tabla VII	Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables inmunes en el capítulo I.	38
Tabla VIII	Variables metabólicas medidas en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo de camarón blanco en tanques de plástico (grupo control y grupo estrés).	45
Tabla IX	Variables metabólicas medidas en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo de camarón blanco en tanques de concreto (grupo control y grupo estrés).	46
Tabla X	Composición proximal y estabilidad en agua de las dietas baja, media y alta en HUFA.	60
Tabla XI	Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables inmunes y composición en ácidos grasos del músculo en el capítulo II.	62
Tabla XII	Principales ácidos grasos en las dietas baja, media y alta en HUFA.	65
Tabla XIII	Composición proximal y estabilidad en agua de las dietas baja y alta en HUFA.	78
Tabla XIV	Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables metabólicas en el capítulo III.	83
Tabla XV	Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables inmunes en el capítulo III.	85
Tabla XVI	Principales ácidos grasos de las dietas baja y alta en HUFA.	89

LISTA DE TABLAS

Tablas	Título	Páginas
Tabla XVII	Principales ácidos grasos en la fracción neutra y polar de los hemocitos de los camarones alimentados con las dietas baja o alta en HUFA, y expuestos a una condición de estrés crónico.	94
Tabla XVIII	Variables metabólicas medidas en los camarones de los grupos control y estrés crónico alimentados con las dietas baja y alta en HUFA.	98
Tabla XIX	Variables metabólicas medidas en los camarones de los grupos control, 1 h y 24 h después de la aplicación del estímulo estresor, alimentados con las dietas baja y alta en HUFA.	103

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Título	Páginas
Figura 1	Volumen de la producción acuícola de camarón en México entre 1990 y 2004.	2
Figura 2	(A) Distribución del camarón blanco del Pacífico <i>L. vannamei</i> ; (B) Principales estados productores de camarón blanco en México.	3
Figura 3	Microscopía óptica; muestra los tres tipos de hemocitos de camarón blanco teñidos con hematoxilina-eosina (100X).	10
Figura 4	Microscopía óptica; vista de hemocitos de camarón teñidos con hematoxilina-eosina (100X).	10
Figura 5	Microscopía electrónica; muestra un hemocito granular de camarón blanco.	11
Figura 6	Reconocimiento de un hongo y degranulación de un hemocito.	17
Figura 7	Sistema experimental en el laboratorio de Genética Acuícola (tanques de plástico).	32
Figura 8	Sistema experimental en el laboratorio de Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos (tanques de concreto).	32
Figura 9	Secuencia del estímulo estresor aplicado en los dos sistemas experimentales.	35
Figura 10	Extracción de hemolinfa de los sacos ventrales de un camarón.	37
Figura 11	Peso y supervivencia determinados en juveniles de camarón blanco en tanques de plástico.	41
Figura 12	Peso y supervivencia determinados en juveniles de camarón blanco en tanques de concreto.	42
Figura 13	Consumo de alimento y ocurrencia de mudas de los camarones de los grupos control y estrés en los tanques de plástico durante el periodo experimental.	43
Figura 14	Variables inmunes medidas en juveniles de camarón blanco en tanques de plástico.	48
Figura 15	Variables inmunes medidas en juveniles de camarón blanco en tanques de concreto.	49
Figura 16	Desempeño biológico de los camarones alimentados con una dieta baja, media y alta en HUFA, respectivamente.	68
Figura 17	Variables inmunes determinadas en camarones alimentados con una dieta baja, media y alta en HUFA, respectivamente.	69
Figura 18	Concentración en HDL-BGBP determinada en el plasma de camarones alimentados con una dieta baja, media y alta en HUFA, respectivamente.	70

Figuras	Título	Páginas
Figura 19	Ácidos grasos altamente insaturados determinados en la fracción neutra del músculo de camarones alimentados con una dieta baja, media y alta en HUFA, respectivamente.	71
Figura 20	Ácidos grasos altamente insaturados determinados en la fracción polar del músculo de camarones alimentados con una dieta baja, media y alta en HUFA, respectivamente.	72
Figura 21	Ejemplo de las huellas que se utilizaron para evaluar el alimento no consumido.	80
Figura 22	Secuencia del estímulo estresor aplicado en los tanques de concreto.	81
Figura 23	Pesos y supervivencia determinados en los camarones de los grupos control y estrés crónico alimentados con las dietas baja y alta en HUFA.	91
Figura 24	Ocurrencia de mudas y consumo de alimento determinados en los camarones de los grupos control y estrés crónico alimentados con las dietas baja y alta en HUFA.	92
Figura 25	VARIABLES INMUNES ANALIZADAS EN LOS CAMARONES DE LOS GRUPOS CONTROL Y ESTRÉS CRÓNICO ALIMENTADOS CON LAS DIETAS BAJA Y ALTA EN HUFA.	97
Figura 26	VARIABLES INMUNES ANALIZADAS EN LOS CAMARONES DE LOS GRUPOS CONTROL, 1 h y 24 h después de la aplicación del estímulo estresor, alimentados con las dietas baja y alta en HUFA.	102

LISTA DE ANEXOS

Anexos	Título	Páginas
Anexo I	Procedimiento para la observación de hemocitos por microscopía óptica y toma de fotos.	143
Anexo II	Procedimiento para la observación de hemocitos por microscopía electrónica y toma de fotos.	145
Anexo III	Artículo proveniente del capítulo I. Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, Á.I., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R., Racotta, I.S., 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> exposed to a repeated handling stress. <i>Aquaculture</i> 258, 633-640.	146
Anexo IV	Formulación, fabricación y análisis proximales de la dieta experimental del capítulo I.	155
Anexo V	Protocolos para la determinación de las variables metabólicas medidas en hemolinfa.	160
Anexo VI	Protocolos para la determinación de las variables metabólicas medidas en hepatopáncreas y músculo.	167
Anexo VII	Protocolos para la determinación de las variables inmunes.	172
Anexo VIII	Formulación, fabricación y análisis proximales de las dietas experimentales del capítulo II.	175
Anexo IX	Determinación de la composición de ácidos grasos en las dietas.	180
Anexo X	Cuantificación de la concentración en HDL-BGBP por Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) y determinación de la concentración de proteínas totales en el plasma.	182
Anexo XI	Determinación de la composición de ácidos grasos en músculo de camarón blanco.	186
Anexo XII	Artículo proveniente del capítulo III. Mercier, L., Racotta, I.S., Yepiz-Plascencia, G., Muhlia-Almazán, A., Civera, R., Quiñones-Arreola, M.F., Wille, M., Sorgeloos, P., Palacios, E., 2007. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> exposed to handling stress. <i>Aquaculture</i> , <i>submitted</i> .	188
Anexo XIII	Formulación, fabricación y análisis proximales de las dietas experimentales del capítulo III.	234
Anexo XIV	Determinación de la composición de ácidos grasos en hemocitos de camarón blanco.	239

LISTA DE TABLAS EN ANEXOS

Tablas	Título	Páginas
Tabla XX	Formulación y composición química esperada de la dieta experimental del capítulo I.	155
Tabla XXI	Composición de la premezcla de vitaminas de la dieta experimental del capítulo I.	158
Tabla XXII	Composición de la premezcla de minerales de la dieta experimental del capítulo I.	158
Tabla XXIII	Formulación y composición química esperada de las dietas experimentales del capítulo II.	175
Tabla XXIV	Composición de la premezcla de vitaminas de las dietas experimentales del capítulo II.	178
Tabla XXV	Composición de la premezcla de minerales de las dietas experimentales del capítulo II.	178
Tabla XXVI	Formulación y composición química esperada de las dietas experimentales del capítulo III.	234
Tabla XXVII	Composición de la premezcla de vitaminas de las dietas experimentales del capítulo III.	237
Tabla XXVIII	Composición de la premezcla de minerales de las dietas experimentales del capítulo III.	237

INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón o camaronicultura es una de las actividades acuícolas con más rápido crecimiento y expansión a nivel mundial. La producción camaronícola en el mundo sobrepasó el millón de toneladas en el año 2000 (FAO, 2002) y en 2003 la producción fue estimada alrededor de 3 millones (FAO Stat., 2006). En México, el cultivo de camarón se inició a partir de 1985 y la actividad ha tenido un crecimiento exponencial en los últimos 10 años, pasando de una producción de 4 mil toneladas en 1990 a más de 33 mil toneladas en el 2000, es decir, un crecimiento de alrededor del 412% en 10 años (Figura 1). Para el 2004, la producción registrada fue de 61 mil toneladas (SAGARPA/CONAPESCA, 2006), incrementándose un 92% en solo cuatro años. Como consecuencia, México es ahora el segundo productor de camarón por acuacultura del hemisferio Oeste (Páez-Osuna, 2001). La principal actividad camaronícola del país está concentrada en un 97% en el Noroeste, principalmente alrededor del Golfo de California, en la zona costera de los estados de Baja California, Baja California Sur, Sinaloa, Sonora y Nayarit (Páez-Osuna *et al.*, 2003) (Figura 2). Las especies cultivadas en las granjas pertenecen principalmente a la familia Penaeidae y al género *Litopenaeus* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997) (ej. camarón blanco *L. vannamei* y camarón azul *L. stylirostris*).

Las enfermedades constituyen hoy en día uno de los principales problemas en el cultivo del camarón, afectando su óptimo rendimiento (Martínez-Córdova, 2002). Los mayores desastres de la industria a nivel mundial han sido a causa de enfermedades infecciosas provocadas por virus (ej. virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética, virus del síndrome de la mancha blanca) o bacterias (ej. *Vibrio*) y por enfermedades no-

infecciosas. Dichas enfermedades se han manifestado más frecuentemente con la intensificación de los cultivos, producto de avances en zootecnia más acelerados que los conocimientos en fisiología, inmunología y ecología (Bachère, 2000). Las enfermedades infecciosas resultan de una compleja interacción entre organismos, el ambiente en el que habitan y los patógenos a los que están expuestos (Lightner y Redman, 1998). El ambiente que prevalece en los cultivos genera frecuentemente una condición de estrés en los camarones debido al cautiverio en sí, a las fluctuaciones de los factores fisico-químicos del agua (ej. temperatura, oxígeno disuelto y pH) y a las propias actividades de manipulación (ej. traslado de organismos, biometría, marcaje para selección genética). Esta condición de estrés aumenta la vulnerabilidad de los camarones a los agentes infecciosos o no-infecciosos presentes en el agua de mar, reduciendo su capacidad de defensa inmune (Le Moullac y Haffner, 2000).

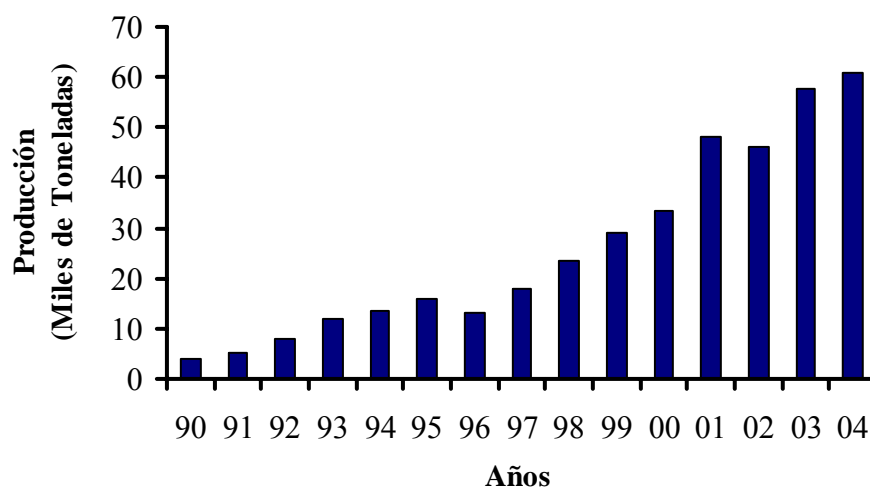


Figura 1. Volumen de la producción acuícola de camarón en México entre 1990 y 2004 (Anuarios Estadísticos de Pesca, 1990; 1991; Carta pesquera, 2004; 2006).

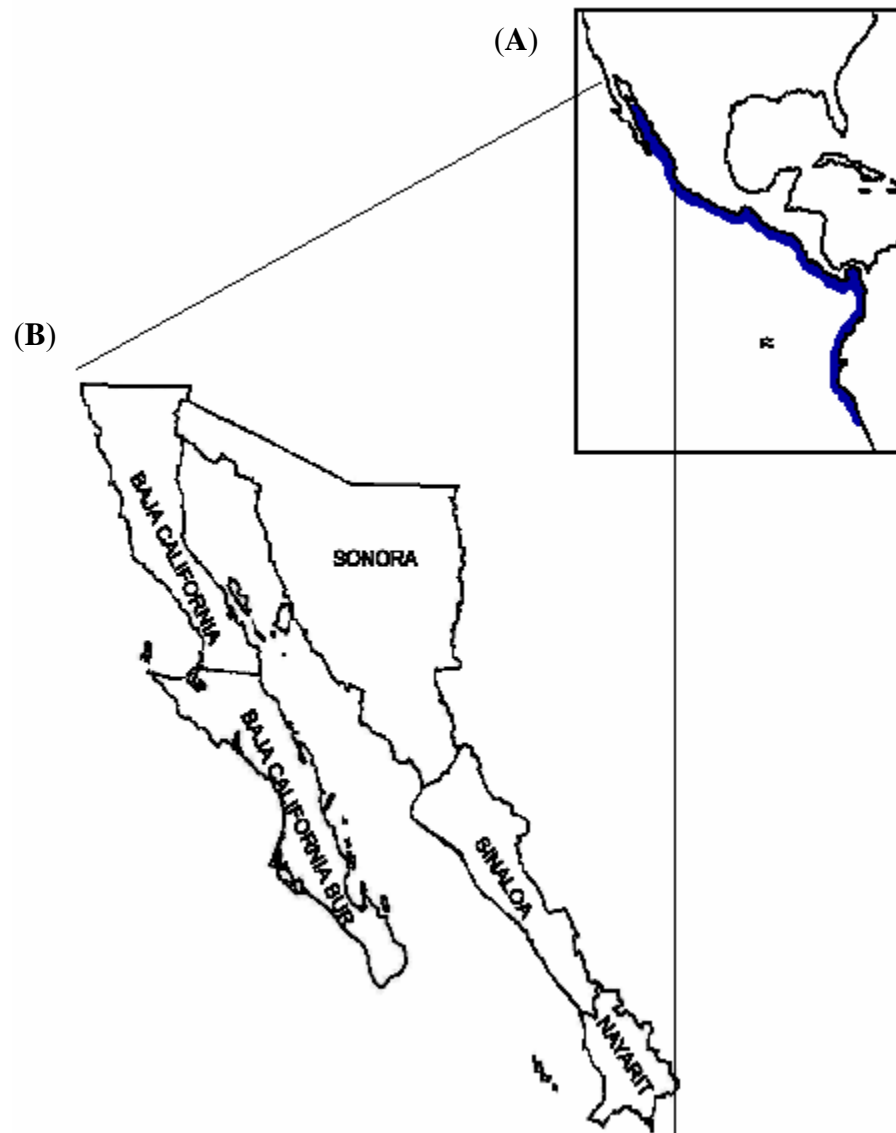


Figura 2. (A) Distribución del camarón blanco del Pacífico *L. vannamei*; (B) Principales estados productores de camarón blanco en México.

En los últimos años, se ha propuesto la utilización de sustancias inmunoestimulantes para incrementar la capacidad de la respuesta inmune de los camarones en cultivo y mejorar su resistencia contra bacterias e infecciones virales (Chang *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005). Estas sustancias, que tienen la cualidad de alertar al sistema inmune del camarón, son generalmente suministradas por inmersión, inyección o a través del alimento. Dentro de las sustancias inmunoestimulantes, se encuentran bacterias vivas o muertas, glucanos, peptidoglucanos, o lipopolisacáridos. También existen sustancias que tienen la capacidad de modular e incrementar la capacidad de respuesta del sistema inmune en diferentes grupos animales. Entre ellas, se encuentran los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés).

En el presente trabajo se investigaron los efectos de estrés crónico por manipulación sobre variables metabólicas e inmunes en el camarón blanco del Pacífico y la posibilidad de incrementar la capacidad de respuesta inmune de los camarones estresados suplementando su dieta con ácidos grasos altamente insaturados.

ANTECEDENTES

A. 1. El camarón blanco del Pacífico

El camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei* Boone 1931 (o *Litopenaeus vannamei* Pérez-Farfante 1969) pertenece al gran filum de los artrópodos (Tabla I). Se distribuye desde el extremo Norte del Golfo de California en México hasta Tumbes en Perú (Méndez, 1981; ver Figura 1). Es una especie característica de fondos suaves (lodosos o arenosos) (Fischer *et al.*, 1995). Los adultos son bentónicos y se capturan entre 5 y 72 m de profundidad (Méndez, 1981). La longitud total máxima reportada del camarón blanco del Pacífico es 187 mm para machos y 230 mm para hembras (Pérez-Farfante, 1988). La reproducción ocurre en mar abierto y los estadios larvales planctónicos están compuestos de seis estadios de nauplio, tres estadios de protozoa y tres estadios de mysis y varios estadios de postlarvas (Kitani, 1986) que son arrastrados por las corrientes a la zona costera. Las postlarvas migran hacia aguas interiores como zonas estuarinas y canales de marea, en donde viven hasta los últimos estadios juveniles para luego regresar a aguas oceánicas (Méndez, 1981).

Tabla I. Ubicación taxonómica del camarón blanco del Pacífico.

Filum	Arthropoda
Subfilum	Crustacea
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>L. vannamei</i>

A. 2. El estrés

El estrés es un concepto que fue inicialmente descrito en vertebrados por Selye en 1936 como el “síndrome general de adaptación” en el cual diferenciaba tres etapas: una de alarma, una de resistencia y otra de agotamiento. Una definición contemporánea del estrés puede ser la condición en la cual el equilibrio dinámico de un organismo (homeostasia) es alterado como resultado de estímulos internos o externos (estresores) (Chrousos y Gold, 1992). Además de romper el equilibrio dinámico, los estímulos producen una serie de respuestas hormonales (respuesta primaria), metabólicas (respuesta secundaria) y de la condición general (respuesta terciaria), que pueden ser compensadoras o adaptativas, en un intento por recuperar el equilibrio. En estudios en peces se ha observado que la respuesta primaria resulta en la activación de los centros cerebrales que provocan una liberación masiva de catecolaminas (vía hipotálamo-sistema nervioso autónomo-tejido cromafín interrenal) y corticoesteroides (vía hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal). Estas hormonas actúan a diferentes niveles (sangre, tejidos y órganos) provocando cambios metabólicos tales como un aumento y movilización de sustratos energéticos (ej. glucosa, ácidos grasos libres), así como un incremento en el consumo de oxígeno y de su transporte, lo que se conoce como respuesta secundaria. Generalmente estos cambios metabólicos tienen como fin la producción de energía para mantener una condición de equilibrio. Finalmente la respuesta terciaria se observa a nivel del individuo, tal como la inhibición del crecimiento y de la reproducción. También se puede manifestar en la disminución de la capacidad de defensa del sistema inmune y en la disminución de la capacidad de tolerar estímulos adicionales (Wendelaar Bonga, 1997).

Recientemente, un nuevo concepto del estrés fue propuesto por Sterling y Eyer (1988) al darse cuenta que la homeostasia, modelo de regulación fisiológica que apoyaba la definición de estrés anterior, no permite explicar algunas enfermedades modernas provocadas por el estrés, como son la hipertensión, la obesidad y la diabetes de tipo II. Estos autores propusieron la sustitución de la homeostasia, que representa la estabilidad a través de la constancia, por la alostasia, la cual definieron como la estabilidad a través del cambio. La alostasia es un modelo de regulación fisiológica opuesto al de la homeostasia ya que asume que el objetivo de la regulación no es ser constante, por el contrario el objetivo es predecir la demanda y ajustar todos los parámetros fisiológicos para encontrarla. Actualmente, este concepto de alostasia no ha sido completamente aceptado como se definió y se emplea más como un modulador de los mecanismos de homeostasia (Sterling, 2004). En varios trabajos (McEwen, 1998; McEwen y Seeman, 1999), la alostasia es interpretada como una respuesta de adaptación al estrés para mantener de cierta forma una condición de homeostasia y la carga alostática representa el costo de esta adaptación.

Los estímulos responsables del estrés pueden ser de diferente naturaleza, como físicos, biológicos o ambientales. Cuando los estímulos se presentan en forma prolongada o continua en el tiempo (de varios días a semanas), aunque no sean necesariamente intensos, la respuesta al estímulo se conoce como estrés crónico. En contraste, cuando los estímulos son puntuales (de minutos a horas), la respuesta se considera como estrés agudo. Las respuestas primarias y secundarias son normalmente rápidas y fácilmente detectables (Livingstone, 1985). Variables metabólicas como los niveles de glucosa (Hall y van Ham,

1998; Racotta y Palacios, 1998), lactato (Racotta y Palacios, 1998), así como la alteración en la capacidad osmoreguladora (Charmantier y Soyez, 1994; Lignot *et al.*, 1997; 1999; 2000) han sido propuestas como indicadores de estrés para diferentes especies de crustáceos. Otras variables metabólicas como la hemocianina, las proteínas totales, los lípidos totales, triacilglicéridos y colesterol pueden ser también utilizados para monitorear el estado nutricional y de salud de los camarones (Sánchez *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003a; Rosas *et al.*, 2004; Carrillo *et al.*, 2006).

La influencia de los estímulos sobre la respuesta inmune de los camarones ha sido reportada por varios autores, particularmente en condiciones ambientales extremas que inducen estrés. Camarones expuestos a concentraciones altas de amonio (Le Moullac y Haffner, 2000; Liu y Chen, 2004), nitritos (Tseng y Chen, 2004), hipoxia (Le Moullac *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2002), salinidades y temperaturas extremas (Vargas-Albores *et al.*, 1998; Perazzolo *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003b) y condiciones de cautiverio (Sánchez *et al.* 2001; Pérez-Jar *et al.*, 2006) han mostrado alteraciones en los componentes celulares y humorales de su sistema inmune. El estrés inducido por estimulación física ha sido menos estudiado. En un experimento, se ha determinado que la ablación del pedúnculo ocular en hembras y la extirpación de los espermatóforos en machos del camarón rosado *Farfantepenaeus paulensis* también afectan el sistema inmune (Perazzolo *et al.*, 2002).

A. 3. Sistema inmune de los camarones peneidos

A lo largo de su evolución, los invertebrados han desarrollado un sistema inmune o de defensa para protegerse de agentes extraños y mantener su integridad biológica. Este

sistema, constituido por una línea de defensa no específica, está clasificado como sistema inmune innato y está formado de componentes humorales y celulares que cooperan entre ellos. En la mayoría de los invertebrados, los componentes humorales están representados por péptidos antimicrobianos (ej. peneidinas), especies reactivas de oxígeno (ej. anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo) y de nitrógeno (ej. óxido nítrico, dióxido de nitrógeno), enzimas que regulan los procesos inmunes (ej. transglutaminasa, enzima activadora de la profenoloxidasa) y moléculas asociadas al reconocimiento de agentes extraños (ej. proteínas de unión a los lipopolisacáridos, β -glucanos y péptidoglucanos).

Por otro lado, el componente celular está compuesto por hemocitos, que son las células sanguíneas. En los camarones peneidos, estas células se originan en el tejido hematopoyético que se localiza en el lado dorsal y dorso-lateral del estómago, alrededor de la arteria antenal y en la base de los maxilípedos, entre otros (Bell y Lightner, 1988). A la fecha, han sido descritos tres tipos de hemocitos en crustáceos, basándose en el tamaño y número de sus gránulos intracelulares principalmente, así como en otros caracteres morfológicos observados por microscopía óptica y electrónica (Bauchau, 1981; Söderhäll y Cerenius, 1992; Johansson *et al.*, 2000). Estos tres tipos de hemocitos son: 1) hialinos, 2) semi-granulares y 3) granulares (Figuras 3, 4, 5). Estos tres tipos de hemocitos también han sido descritos en camarones peneidos (Martin y Graves, 1985; Tsing *et al.*, 1989; Vargas-Albores *et al.*, 2005) pero todavía existe controversia sobre sus funciones particulares y aún se desconoce si los diferentes tipos de hemocitos provienen de un mismo o de varios linajes celulares.

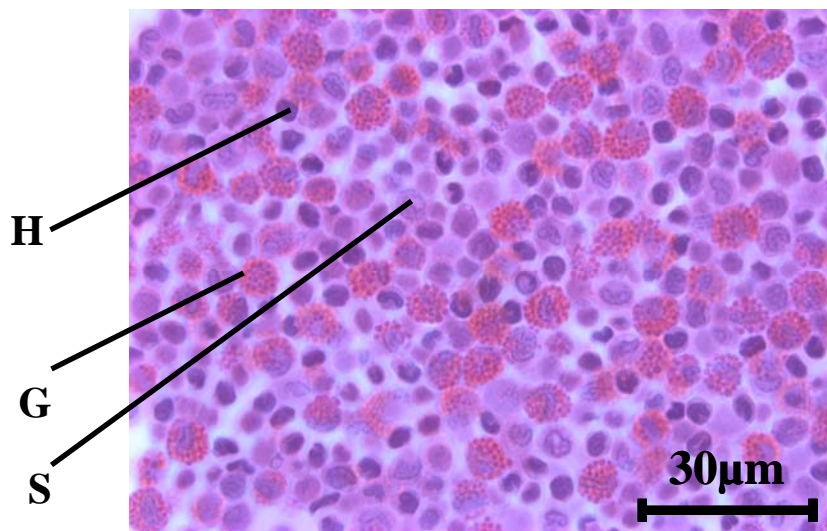


Figura 3. Microscopía óptica; muestra los tres tipos de hemocitos de camarón blanco teñidos con hematoxilina-eosina (100X). Hemocitos hialinos (H), semi-granulares (S) y granulares (G). La técnica utilizada para la observación de hemocitos por microscopía óptica y la toma de fotos se describen en el Anexo I.

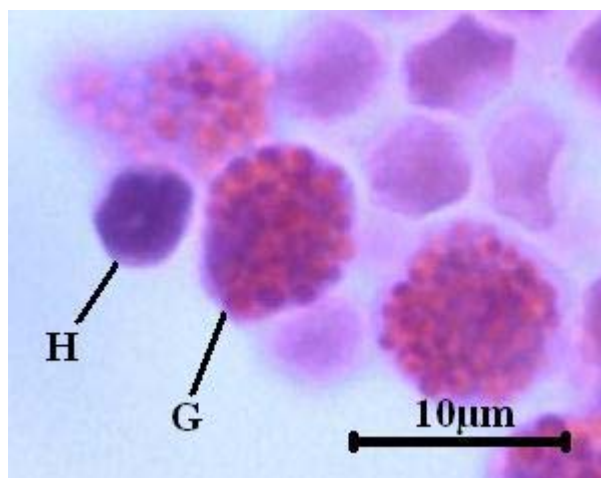


Figura 4. Microscopía óptica; vista de hemocitos de camarón teñidos con hematoxilina-eosina (100X). Hemocito hialino (H) y granular (G). La técnica utilizada para la observación de hemocitos por microscopía óptica y la toma de fotos se describen en el Anexo I.

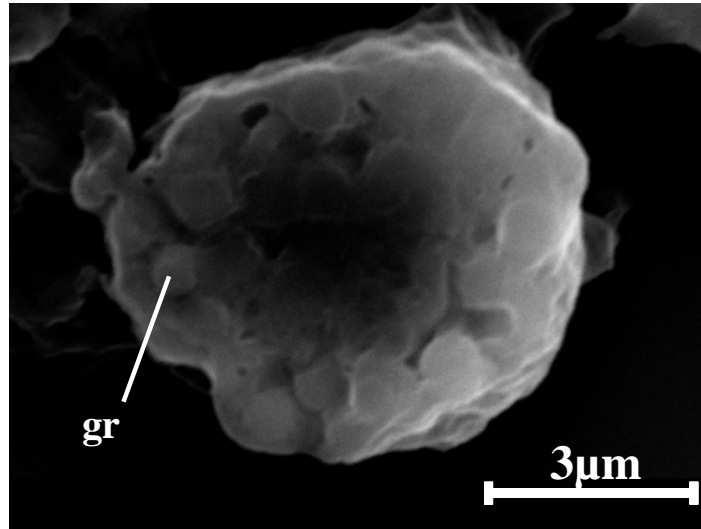


Figura 5. Microscopía electrónica; muestra un hemocito granular de camarón blanco. Gránulo (gr). La técnica utilizada para la observación de hemocitos por microscopía electrónica y la toma de fotos se describen en el Anexo II.

Los hemocitos hialinos de los camarones peneidos son, como en otros crustáceos, los más pequeños ($\sim 7 - 8 \mu\text{m}$), tienen una forma redondeada y se caracterizan por un gran núcleo céntrico (Figuras 3 y 4). No tienen gránulos intracelulares aunque su citoplasma puede presentar algunas inclusiones cuando el hemocito es observado por microscopía electrónica (Martin y Graves, 1985; Tsing *et al.*, 1989; Vargas-Albores *et al.*, 2005). La función de estos hemocitos no está bien definida; sin embargo, en otros crustáceos como son el langostino de agua dulce y los cangrejos, se ha reportado que están involucrados en el proceso de fagocitosis, que es la ingestión de partículas biogénicas o abiogénicas (Johansson *et al.*, 2000). Estos hemocitos también se han asociado al proceso de coagulación (Clare y Lumb, 1994) donde previenen la pérdida de hemolinfa después de una herida en el exoesqueleto y la diseminación de las bacterias en el cuerpo. La coagulación ocurre como resultado de la polimerización de una proteína presente en el plasma llamada proteína coaguladora (CP por “Clotting Protein” en inglés) y es un proceso catalizado por una transglutaminasa dependiente de iones calcio liberados por los hemocitos hialinos (Lee y Söderhäll, 2002).

Los hemocitos granulares son los más grandes ($\sim 18 \mu\text{m}$). Tienen una forma ovoide, presentan un núcleo pequeño que puede ser en forma de riñón y cuentan con numerosos gránulos de entre 0.8 y $1.1 \mu\text{m}$ de diámetro (Martin y Graves, 1985; Tsing *et al.*, 1989; Vargas-Albores *et al.*, 2005; Figuras 3, 4, 5). Su función principal es el almacenamiento y la liberación del sistema profenoloxidasa (sistema proFO) contenido principalmente en los gránulos (Vargas-Albores *et al.*, 1993; Hernández-López *et al.*, 1996; Le Moullac *et al.*, 1997; Vargas-Albores *et al.*, 2005). Una vez liberada en la hemolinfa, la proFO es

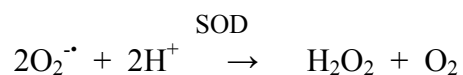
transformada en fenoloxidasa (FO) por acción de una proteinasa llamada enzima activadora de la proFO (Vargas-Albores *et al.*, 1999). Esta última presente en forma inactiva en el interior de los gránulos de los hemocitos se activa después de su liberación, en presencia del calcio plasmático. La fenoloxidasa (FO) es una enzima que lleva a cabo la síntesis de melanina (Johansson y Söderhäll, 1989), la cual está implicada en los procesos de esclerotización y reparación de daños de cutícula (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). La melanina se puede detectar en los camarones por la presencia de puntos negros e interviene también durante la formación de nódulos y/o encapsulación de patógenos (Cerenius y Söderhäll, 2004). Además, la melanización produce intermediarios de la quinona que son tóxicos y altamente reactivos. Los granulocitos también almacenan las peneidinas, que son péptidos antimicrobianos que actúan principalmente contra bacterias Gram positivas y hongos (Destoumieux *et al.*, 2000a; b; Bachère *et al.*, 2004).

Por último, los hemocitos semi-granulares tienen un tamaño similar a los hemocitos granulares pero sus gránulos son más pequeños (0.4 - 0.6 μm) y menos abundantes (Martin y Graves, 1985; Tsing *et al.*, 1989; Vargas-Albores *et al.*, 2005; Figura 3). Estos hemocitos parecen estar principalmente involucrados en la fagocitosis, el almacenamiento y la liberación del sistema proFO, así como en la encapsulación de partículas demasiado grandes para ser fagocitadas (Vargas-Albores *et al.*, 2005). También, estos hemocitos son almacenadores de peneidinas, pero en menor cantidad que el tipo de hemocito anterior (Destoumieux *et al.*, 2000a; b; Bachère *et al.*, 2004).

En juveniles de *L. vannamei*, Vargas-Albores *et al.* (2005) reportaron aproximadamente una proporción de hemocitos hialinos, semi-granulares y granulares de

25%, 53% y 22% respectivamente. Sin embargo, esta proporción puede variar en la misma especie en función de varios factores como es el estadio de muda (Le Moullac *et al.*, 1997).

Acoplado al proceso de fagocitosis, se producen especies reactivas del oxígeno altamente tóxicas, que actúan destruyendo el material extraño (Campa-Córdova *et al.*, 2002). La primera especie en formarse es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y surge a partir de la reducción de una molécula de oxígeno por la NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa) (Song y Hsieh, 1994; Bachère *et al.*, 1995; Muñoz *et al.*, 2000). Esta reducción se conoce también como estallido respiratorio (“respiratory burst” en inglés). El anión superóxido puede dañar (función oxidante) a las células hospederas (hemocitos) si sale de la vacuola fagocítica (Warner, 1995). Para evitar este daño celular, la superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión del anión superóxido (función antioxidante) a peróxido de hidrógeno y oxígeno mediante la siguiente reacción:



El producto de la reacción de la SOD es potencialmente mucho más dañino que el propio anión superóxido. Una suposición frecuente es que cualquier incremento significativo de la actividad de la SOD debe estar acompañado de un aumento comparable en la actividad de las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa que permiten la conversión del peróxido de hidrógeno en H_2O , y así prevenir la formación del nocivo radical hidroxilo OH^{\cdot} a partir del peróxido de hidrógeno (Hernández-Saavedra, 1997).

Algunas variables inmunológicas fueron sugeridas para monitorear la capacidad de defensa inmune en camarones peneidos, entre las cuales se encuentran el conteo total o diferencial de hemocitos, la producción de especies reactivas del oxígeno, la actividad de la profenoloxidasas y fenoloxidasas, así como la actividad de péptidos antibacterianos y la concentración de proteína plasmática (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

Las diferentes funciones celulares de los hemocitos, descritas anteriormente, se activan con la presencia de moléculas propias de las paredes de las bacterias y hongos tales como los lipopolisacáridos (en bacterias Gram negativas), los β -glucanos (en hongos) y los peptidoglucanos (en bacterias Gram positivas). Recientemente, se demostró que esta activación puede ser amplificada por proteínas plasmáticas particulares como la HDL-BGBP (por las siglas en inglés High Density Lipoprotein-Beta Glucan Binding Protein) (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

La HDL-BGBP es una lipoproteína de alta densidad presente en el plasma de los peneidos (tanto en machos como en hembras). Por ejemplo, se ha aislado del camarón blanco *L. vannamei* (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995; 1998), del camarón café *Farfantepenaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1996; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998) y del camarón azul *L. stylirostris* (Vargas-Albores *et al.*, 1997). En *L. vannamei*, esta lipoproteína representa aproximadamente el 1% de las proteínas plasmáticas y está compuesta por una apoproteína cuyo peso molecular es cercano a los 100 kDa (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995; Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997). La HDL-BGBP contiene cerca de 57% de lípidos, principalmente fosfolípidos, pero también esteroides, acilglicéridos y ácidos grasos libres (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997). La HDL-BGBP en *L. vannamei* ha sido

purificada por tres diferentes métodos; cromatografía de afinidad utilizando laminarina (Vargas-Albores *et al.*, 1997), heparina (Jiménez-Vega *et al.*, 2002) y ultracentrifugación, utilizando un gradiente de densidad de bromuro de potasio (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995; 1998). Esta lipoproteína es sintetizada en el hepatopáncreas (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000) y se demostró que la expresión genética para dicha síntesis está influenciada por los componentes de la dieta y el régimen de alimentación de los camarones (Muhlia-Almazán *et al.*, 2005). La HDL-BGBP presenta una doble función, una de ellas es el transporte de lípidos desde sitios de absorción o reservas hasta sitios de utilización. La otra función se relaciona con la defensa inmune reconociendo los componentes presentes en las paredes celulares de los hongos (β -glucanos) y amplificando la acción del sistema proFO (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Para desarrollar esta última función, la HDL-BGBP parece contar con dos sitios susceptibles de ser activados: uno para el componente microbiológico y otro para el hemocito. El segundo sitio parece ser disponible solamente después de la activación del primero y la unión de la HDL-BGBP con la superficie de los hemocitos estimula la liberación de sus gránulos (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000; Figura 6). En otras palabras, la HDL-BGBP no puede ligarse a un hemocito sin haber previamente reaccionado con un β -glucano, lo cual fue propuesto por Duvic y Söderhäll (1992) quienes estudiaron los receptores de la HDL-BGBP en los hemocitos del langostino de agua dulce, *Pacifastacus leniusculus*.

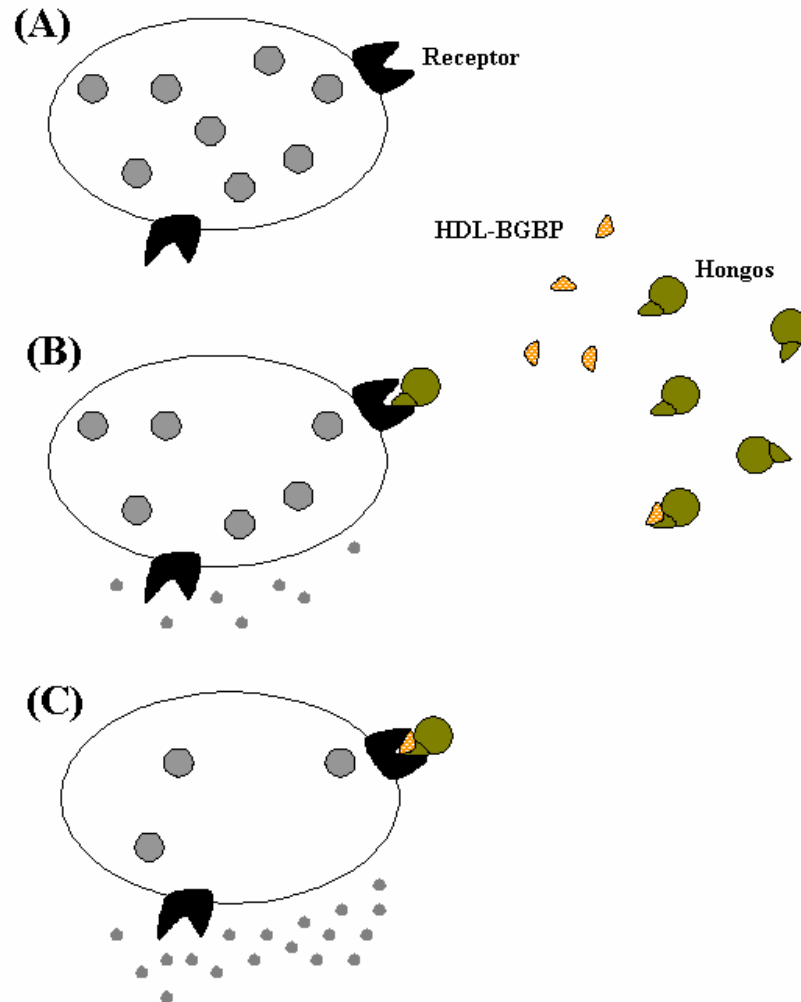


Figura 6. Reconocimiento de un hongo y degranulación de un hemocito. (A) representa un hemocito granular con receptores de membrana. (B) representa el reconocimiento de un hongo el cual promueve la degranulación del hemocito y la liberación del sistema proFO. (C) representa una molécula de HDL-BGBP unida a un hongo y al ser reconocida por el receptor amplifica la degranulación y liberación del sistema proFO.

A. 4. Ácidos grasos altamente insaturados

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos que están compuestos por una cadena de carbonos hidrofóbica (entre 4 y 36 carbonos) y un extremo carboxilo hidrofílico (Nelson y Cox, 2000). La cadena de carbonos puede o no presentar dobles enlaces, clasificándose así

los ácidos grasos en saturados (sin dobles enlaces), monoinsaturados (un doble enlace) y poli-insaturados (dos o más dobles enlaces). Los ácidos grasos poli-insaturados que tienen cuatro o más dobles enlaces son llamados altamente insaturados o HUFA (Sargent, 1995). En animales se distinguen principalmente los ácidos grasos de la serie n-9, n-6 y n-3 en función de la posición del primer doble enlace a partir del extremo hidrofóbico (grupo metil) (Corraze, 1999). Solo una muy baja proporción de ácidos grasos se encuentra en forma libre, la mayor parte está asociada a una molécula de glicerol o esfingosina. Entre los más importantes están los triacilglicéridos, los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos. Los triacilglicéridos son acilgliceroles compuestos por una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos y su función es principalmente energética. Por otro lado, los glicerofosfolípidos (comúnmente llamados fosfolípidos) son moléculas compuestas de un glicerol unido a dos ácidos grasos y un grupo fosfato, el cual se une a otro grupo que determina su nombre (colina, serina, etanolamina o inositol). Los esfingolípidos están compuestos de una molécula de esfingosina unida a un ácido graso y una fosfocolina o glucosa. Los glicerofosfolípidos y esfingolípidos tienen una función esencialmente estructural (Nelson y Cox, 2000).

Los HUFA como el ácido araquidónico (AA; 20:4n-6), el ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) y el ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3) son considerados como esenciales en los camarones peneidos. Los camarones, al igual que en la mayoría de los crustáceos marinos, tienen una capacidad limitada para sintetizar HUFA a partir del ácido linoléico (18:2n-6) y el ácido linolénico (18:3n-3) (Castell, 1983; D'Abramo, 1997). Como sucede en gran parte de los organismos marinos, los HUFA deben provenir de la dieta

(Sargent, 1995). Se ha reportado que un suplemento de HUFA en la dieta mejora el crecimiento y/o la supervivencia de los camarones peneidos durante las etapas de larva (Léger y Sorgeloos, 1992), postlarva (Millamena *et al.*, 1988; Rees *et al.*, 1994; Kontara *et al.*, 1997) y juvenil (González-Félix *et al.*, 2003) (ver Tablas II y III). Kanazawa *et al.* (1979) sugirieron un suplemento de 1% de HUFA de la serie n-3 como valor mínimo para alimentar postlarvas de *Marsupenaeus japonicus*. González-Félix y Perez-Velazquez (2002) concluyeron que los requerimientos de juveniles de *L. vannamei* parecen ser satisfechos con 0.5% de HUFA n-3 en la dieta e incluso propusieron que este nivel podría ser aún más bajo. Estos mismos autores reportaron una disminución en el crecimiento cuando se alimentaron los juveniles de *L. vannamei* con dietas con 2% de HUFA n-3.

Por otro lado, también se ha demostrado la importancia de los HUFA durante la reproducción. Al respecto, se ha reportado que el enriquecimiento de la dieta con HUFA n-3 mejora el desempeño reproductivo y/o la calidad de la progenie en *L. vannamei* (Cahu *et al.*, 1994; Wouters *et al.*, 1999) y otros camarones peneidos (Xu *et al.*, 1994a; Cahu *et al.*, 1995). Por último, se ha mostrado que los HUFA favorecen la resistencia de los camarones peneidos expuestos a un estresor agudo de tipo ambiental (ver Tabla IV). Por ejemplo, Rees *et al.* (1994) observaron que las postlarvas de *Penaeus monodon* sometidas a un choque osmótico tuvieron mejor supervivencia cuando fueron alimentadas con *Artemia* que contenía 1.3% de HUFA n-3. Kontara *et al.* (1997) reportaron una mejor resistencia en postlarvas de *M. japonicus* ante un estrés osmótico al incrementar el nivel de HUFA n-3 de 0 a 0.5% (con fosfatidilcolina en la dieta) o de 0.5 a 1% (sin fosfatidilcolina en la dieta). Palacios *et al.* (2004) observaron una mayor supervivencia en postlarvas de *L. vannamei*

sometidas a una prueba de salinidad (0‰) cuando fueron alimentadas con *Artemia* conteniendo 35.3% HUFA del total de sus ácidos grasos. Asimismo, Chim *et al.* (2001) concluyeron que juveniles de *L. stylirostris* tuvieron una mayor supervivencia ante cambios de temperatura (de 28°C a 17°C) y de salinidad (de 35‰ a 10‰) durante 4 días cuando fueron alimentados con una dieta enriquecida con 1.4% de HUFA n-3.

Tabla II. Crecimiento (CO) y supervivencia (SA) en postlarvas de camarones peneidos después de ser alimentados con dietas enriquecidas en HUFA.

Especies	Estadio	CO*	SA	Alimentación			Referencia
				Tipo	% HUFA [§] o DHA/EPA	Tiempo (días)	
<i>P. monodon</i>	PL30	+	+	<i>Artemia alimentada con Chaetoceros calcitrans o Dunalliella sp.</i>	AA + EPA <i>Chaetoceros</i> = 21.22% del total de los AG AA + EPA <i>Dunalliella</i> = 6.75% del total de los AG	20	Millamena <i>et al.</i> (1988)
<i>P. monodon</i>	PL10	-	+	<i>Artemia</i>	1.7% HUFA n-3 o 2.8% HUFA	10	Rees <i>et al.</i> (1994)
<i>M. japonicus</i>	PL	+	-	<i>Artemia</i>	0.5% HUFA n-3 con FC	20	Kontara <i>et al.</i> (1997)
<i>M. japonicus</i>	PL	+	-	<i>Artemia</i>	1% HUFA n-3 sin FC	20	Kontara <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	PL10	-	-	<i>Microalga, Rotífero y Artemia</i>	DHA/EPA rotífero = 0.7, 1.53 y 2.25 DHA/EPA <i>Artemia</i> = 0.45, 1.08 y 1.77	17	Wouters <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	PL35	+	-	<i>Micro-dieta</i>	DHA/EPA = 0.6, 0.9, 1.8 y 3.64	25	Wouters <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	PL20	-	- ^Δ	<i>Artemia</i>	35.3% HUFA del total de los AG	20	Palacios <i>et al.</i> (2004)

Las abreviaciones o símbolos utilizados son los siguientes: ningún incremento significativo (-); incremento significativo (+); Postlarva (PL), Fosfatidilcolina (FC), Ácidos grasos (AG). *Tasa de crecimiento, peso final o ganancia de peso. [§]Puede representar el porcentaje de HUFA en función del total de los AG, el porcentaje de HUFA remanente en el alimento, o el porcentaje de HUFA suministrado al alimento. ^ΔSupervivencia entre PL10 y PL20.

Tabla III. Crecimiento (CO) y supervivencia (SA) en juveniles de camarones peneidos después de ser alimentados con dietas enriquecidas en HUFA.

Especies	Estadio	CO*	SA	Alimentación			Referencia
				Tipo	% HUFA [§]	Tiempo	
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	J	+	+	Alimento peletizado	1% DHA	32 días	Xu <i>et al.</i> (1993)
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	J	+	+	Alimento peletizado	1% DHA	60 días	Xu <i>et al.</i> (1994b)
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	J	+	+	Alimento peletizado	0.5% AA + 0.5% DHA	60 días	Xu <i>et al.</i> (1994b)
<i>L. stylirostris</i>	J	ND	–	Alimento peletizado	1.4% HUFA n-3	21 días	Chim <i>et al.</i> (2001)
<i>L. vannamei</i>	J	+	–	Alimento peletizado, con 6.5% de aceite de menhaden	ND pero aceite rico en EPA y DHA	10 semanas	Lim <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	J	+	–	Alimento peletizado, con 5% de aceite de menhaden y 3.1% FL	AA + EPA + DHA = 15.16% del total de los AG	8 semanas	González-Félix <i>et al.</i> (2002b)
<i>L. vannamei</i>	J	+	–	Alimento peletizado	0.5% HUFA n-3 con diferentes niveles de lípidos en la dieta	6 semanas	González-Félix <i>et al.</i> (2002a)
<i>L. vannamei</i>	J	+	–	Alimento peletizado	0.25% HUFA y 3% FL	6 semanas	González-Félix <i>et al.</i> (2002c)
<i>L. vannamei</i>	J	+	–	Alimento peletizado	0.5% HUFA n-3	6 semanas	González-Félix <i>et al.</i> (2003)

Las abreviaciones o símbolos utilizados son los siguientes: ningún incremento significativo (–); incremento significativo (+); No Determinado (ND); Juvenil (J), Fosfolípidos (FL), Ácidos grasos (AG). *Tasa de crecimiento, peso final o ganancia de peso. [§]Puede representar el porcentaje de HUFA en función del total de los AG, el porcentaje de HUFA remanente en el alimento, o el porcentaje de HUFA suministrado al alimento.

Tabla IV. Resistencia al estrés en camarones peneidos sometidos a diferentes estresores después de ser alimentados con dietas enriquecidas en HUFA.

Especies	Estadio	Resistencia al estrés	Estresor	Alimentación			Referencia
				Tipo	% HUFA [§] o DHA/EPA	Tiempo (días)	
<i>P. monodon</i>	PL10	+	Choque osmótico	<i>Artemia</i>	1.3% HUFA n-3	5	Rees <i>et al.</i> (1994)
<i>M. japonicus</i>	PL	+	Choque osmótico	<i>Artemia</i>	0.5% HUFA n-3 con FC	20 y 40	Kontara <i>et al.</i> (1997)
<i>M. japonicus</i>	PL	+	Choque osmótico	<i>Artemia</i>	1% HUFA n-3 sin FC	20 y 40	Kontara <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	PL10	-	Choque osmótico	<i>Microalga, Rotífero y Artemia</i>	DHA/EPA rotífero = 0.7, 1.53 y 2.25 DHA/EPA <i>Artemia</i> = 0.45, 1.08 y 1.77	17	Wouters <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	PL11	+	Ejercicio contra corriente	<i>Microalga, Rotífero y Artemia</i>	DHA/EPA rotífero = 0.7 y 1.53 DHA/EPA <i>Artemia</i> = 0.45 y 1.08	18	Wouters <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	PL35	-	Choque osmótico	<i>Micro-dieta</i>	DHA/EPA = 0.6, 0.9, 1.8 y 3.64	25	Wouters <i>et al.</i> (1997)
<i>L. vannamei</i>	PL20	+	Choque osmótico	<i>Artemia</i>	35.3% HUFA del total de los AG	20	Palacios <i>et al.</i> (2004)
<i>L. stylirostris</i>	J	+	Decremento temperatura y salinidad	<i>Alimento peletizado</i>	1.4% HUFA n-3	25	Chim <i>et al.</i> (2001)

Las abreviaciones o símbolos utilizados son los siguientes: ningún incremento significativo (-); incremento significativo (+); Postlarva (PL), Juvenil (J), Fosfatidilcolina (FC), Ácidos grasos (AG). [§]Puede representar el porcentaje de HUFA en función del total de los AG, el porcentaje de HUFA remanente en el alimento, o el porcentaje de HUFA suministrado al alimento.

Además de las funciones descritas anteriormente, se ha demostrado que los HUFA tienen un papel modulador en la respuesta inmune tanto en humanos como en otros grupos animales. Particularmente en humanos, se reportó que el consumo de aceite de pescado proveniente de aguas frías, el cual es rico en HUFA n-3 como el EPA y DHA, modula las funciones de las células del sistema inmune (ej. proliferación de linfocitos, actividad citotóxica del linfocito T) y la comunicación entre células (ej. producción de eicosanoides y citotoxinas) (Calder, 1998; Calder, 2001). Por lo tanto, incluir niveles altos de HUFA n-3 en la dieta se utiliza para contrarrestar los efectos de algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (ej. psoriasis, artritis reumatoide, enfermedad de Bowel) y está recomendado para pacientes que van a recibir un trasplante de órganos (Calder, 1998; Calder, 2006). Los HUFA n-3 en la dieta también se han recomendado como agentes protectores contra enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y diabetes tipo II (Das, 1991; Haglund, 1993; Simopoulos, 2001). En los peces, se ha reportado que el efecto de los HUFA sobre la respuesta inmune consiste en modular la actividad citotóxica, quimiotáctica (Ashton *et al.*, 1994), fagocítica y la producción de anticuerpos (Kiron *et al.*, 1995). Por otro lado, Montero *et al.* (2004) mostraron que una dieta deficiente en HUFA n-3 reducía el volumen de los eritrocitos incrementando su fragilidad, el contenido de hemoglobina, el conteo de células rojas, la actividad neutrofila y el número de linfocitos circulantes en juveniles del pez dorado *Sparus aurata*.

Para los bivalvos, Delaporte *et al.* (2003) señalaron que altos niveles de EPA y AA en la dieta tienen un efecto positivo sobre el conteo total, la fagocitosis y la actividad oxidativa de los hemocitos de la almeja japonesa, *Ruditapes philippinarum*. Hégaret *et al.*

(2004) encontraron también que la calidad de las microalgas que administraron en la dieta del ostión de manglar *Crassostrea virginica* afectó algunos parámetros de sus hemocitos. Delaporte *et al.* (2007) observaron que el conteo total de hemocitos (principalmente hemocitos hialinos) se incrementó después de alimentar durante 4 semanas al ostión japonés *C. gigas* con una emulsión lipídica rica en EPA a razón del 50% del peso seco de la ración algal.

En el caso de los camarones, a la fecha solo existe el trabajo de Chim *et al.* (2001) donde se estudió el papel de los HUFA en el sistema inmune. Estos autores demostraron una mejora del potencial de la defensa inmune y de la resistencia a un estímulo ambiental en juveniles de *L. stylirostris* después de alimentarlos con una dieta rica en HUFA n-3, y propusieron que los HUFA ayudan a mantener la estructura y función de las membranas celulares ante un estrés ambiental. También, sugirieron que los HUFA presentes en la fracción lipídica de las lipoproteínas del plasma podrían mejorar el reconocimiento de los cuerpos extraños, lo que incrementaría la eficiencia de los mecanismos de defensa inmune.

Los mecanismos que se activan para modular el sistema inmune cuando incrementan los niveles de HUFA están siendo estudiados en vertebrados principalmente. En humanos y otros mamíferos, existen evidencias de que los HUFA intervienen en el sistema de defensa influenciando las propiedades físicas de las membranas de las células inmunes, de las enzimas asociadas a las membranas y de los receptores (Peck, 1994). También, la modulación puede ocurrir a través de la peroxidación de los lípidos, la alteración de la expresión de genes, inhibición de la muerte programada de las células (o apoptosis) y la producción de eicosanoides (de Pablo *et al.*, 2002). Una de las funciones

más importantes de los HUFA sobre el sistema inmune parece ser la biosíntesis de eicosanoides a partir del AA o EPA. Mientras que los eicosanoides sintetizados a partir de los AA han mostrado tener efectos pro-inflamatorios (ej. producción de fiebre, incremento de la permeabilidad vascular y dilatación, producción de citocinas inflamatorias), los eicosanoides resultantes del EPA parecen ser menos potentes que los anteriores (Calder, 2006).

Recientemente, un nuevo grupo de mediadores sintetizados a partir del EPA (“resolvins”) parecen tener específicamente funciones anti-inflamatorias (Serhan *et al.*, 2000). Al respecto, Stanley y Miller (2006) mencionaron que en los insectos, los eicosanoides sintetizados a partir del AA por la acción de la ciclooxigenasa, lipoxigenasa o citocromo P450 modulan la fagocitosis, la microagregación y las reacciones de nodulación y extensión de los hemocitos. Cuando se produce un estímulo por parte de un cuerpo extraño, los hemocitos producen y secretan eicosanoides en la hemolinfa que influyen la acción y el comportamiento de otros hemocitos. También reportaron que algunos patógenos inhiben el sistema de defensa de los insectos interrumpiendo la biosíntesis de estos eicosanoides. Por otro lado, el efecto de los HUFA sobre los niveles totales de distintas lipoproteínas y de las proporciones de lípidos en cada lipoproteína puede amplificar el reconocimiento de los cuerpos extraños por parte de los hemocitos.

JUSTIFICACIÓN

Las consecuencias negativas del estrés crónico sobre la susceptibilidad a enfermedades son bien conocidas en vertebrados, pero han sido menos estudiadas en crustáceos. El conocer los efectos del estrés sobre algunas variables metabólicas podrá ayudar a los acuicultores a detectar rápidamente una condición de estrés por manejo en los cultivos, y así tomar medidas pertinentes para evitar pérdidas en la producción. Por otro lado, el evaluar si los HUFA tienen un efecto compensador sobre las respuestas inmunes al estrés en *L. vannamei* permitirá elaborar dietas que incrementen la resistencia al estrés de los juveniles durante el cultivo.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar las respuestas metabólicas e inmunes en *L. vannamei* sometido a una condición de estrés crónico de manipulación y determinar si los HUFA tienen una influencia sobre estas dos respuestas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar las respuestas metabólicas e inmunes bajo condición de estrés crónico de manipulación en *L. vannamei*.

- 2) Evaluar el efecto del suplemento de diferentes concentraciones de HUFA en la dieta sobre la respuesta inmune, particularmente sobre la HDL-BGBP.
- 3) Evaluar si el suplemento de HUFA en la dieta influye la respuesta metabólica e inmune del camarón blanco *L. vannamei* cuando está sometido a una situación de estrés crónico.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1) El estrés crónico por manipulación induce una movilización de reservas energéticas dando lugar a cambios metabólicos.
- 2) El estrés por manipulación disminuye la capacidad de respuesta inmune a niveles de efectores humorales y celulares.
- 3) El suplemento de HUFA en la dieta modifica la concentración de HDL-BGBP, lo cual podría favorecer el reconocimiento de las partículas extrañas y aumentar la eficiencia de los mecanismos de defensa inmune del camarón blanco.
- 4) El suplemento de HUFA en la dieta disminuye la susceptibilidad del camarón ante una condición de estrés crónico, al influenciar las propiedades de efectores celulares y humorales de la respuesta inmune y al minimizar las consecuencias adversas de la respuesta metabólica de estrés.
- 5) Los HUFA administrados en la dieta modifican la composición lipídica de las membranas de los hemocitos, lo cual puede tener consecuencias sobre sus propiedades funcionales y puede modular la capacidad de respuesta inmune.

CAPÍTULO I

Respuestas metabólicas e inmunes de *L. vannamei*

cultivado en condiciones de estrés crónico

(ver artículo publicado Mercier *et al.*, 2006; Anexo III).

El objetivo del presente experimento fue determinar las respuestas metabólicas e inmunes bajo condiciones de estrés crónico de manipulación en *L. vannamei*. Este experimento se realizó en dos distintos sistemas experimentales para identificar en qué sistema se podían determinar mejor estas respuestas.

I. 1. Metodología

I. 1. 1. Diseño experimental

Se capturaron juveniles de camarón blanco del Pacífico *L. vannamei* en un estanque de marea del CIBNOR y se transfirieron a los laboratorios de Genética Acuícola y Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos. En el laboratorio de Genética Acuícola, se registró el peso individual (peso inicial; 10.2 ± 1.2 g; promedio \pm desviación estándar DE) y se colocaron 6 camarones por tanque de plástico (0.70 m \times 0.38 m \times 0.18 m) para tener una densidad de 22 organismos por m². Dos grupos con cinco réplicas (tanques) cada uno fueron acondicionados: uno fue denominado control y el otro estrés (Figura 7). Las condiciones en las que se mantuvieron los organismos fueron las siguientes: agua filtrada ($1 \mu\text{m}$) y pasada por luz UV, recambio manual del agua al 100% diario, fotoperíodo controlado de manera artificial con intervalos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (7:00 am – 7:00 pm), temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidad de $36 \pm 1\text{‰}$ y aireación permanente. Cada tanque fue cubierto por una tela tipo mosquitero para evitar que los camarones se escapen. En el laboratorio de Biología Reproductiva, se pesaron (peso inicial, 11.2 ± 1.8 g; promedio \pm DE) y se colocaron 30 organismos por tanque de concreto (1.38 m \times 1.11 m \times 0.45 m) para mantener una densidad de aproximadamente 20

organismos por m². Seis tanques, divididos en dos grupos de tres réplicas cada uno, fueron acomodados: uno fue denominado estrés y el otro control (Figura 8). Los tanques de concreto se encontraban en un área cubierta por una lámina de metal y rodeado por plástico transparente tipo invernadero. Los organismos se mantuvieron en condiciones de flujo continuo de agua filtrada a 15 µm (recambio de 200% diario), fotoperíodo natural (aproximadamente 13 horas luz y 11 horas oscuridad), temperatura de 25 ± 2°C, salinidad de 36 ± 2‰ y aireación constante. Cada tanque estaba cubierto a la mitad por un plástico negro para evitar que los camarones se escapen y para reducir ligeramente la iluminación.



Figura 7. Sistema experimental en el laboratorio de Genética Acuícola (tanques de plástico).



Figura 8. Sistema experimental en el laboratorio de Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos (tanques de concreto).

Los camarones fueron aclimatados durante 10 días. En el sistema de tanques de plástico, diariamente durante la aclimatación y el experimento, se sifonearon los tanques para estimar el alimento no consumido de forma semi-cuantitativa, los organismos muertos y la ocurrencia de mudas. El alimento no consumido se cuantificó contando el número de pelets grandes y chicos y transformándolo en peso a partir de un promedio previamente establecido para cada tamaño de pelet. En los tanques de concreto, se sifoneó una vez a la semana debido a que la manipulación con el sifón era más perturbante para los animales en estos tanques. Se registraron y sacaron diariamente los ejemplares muertos pero, no se pudieron determinar el consumo de alimento y la ocurrencia de mudas.

I. 1. 2. Dieta experimental

La dieta experimental fue diseñada en base a los requerimientos nutricios reportados para juveniles de camarón blanco (Akiyama y Dominy, 1989; Camba *et al.*, 1993). El alimento fue formulado para contener 35% de proteínas, 8% de lípidos y 4,323 Cal g⁻¹ de energía (Anexo IV, A y B), en la planta de fabricación de alimento del CIBNOR. Se realizó en forma de pelets y se administró dos veces al día (10:00 am – 6:00 pm) a saciedad aparente (entre 3 y 4% de la biomasa). Se analizó también la composición proximal de la dieta (Anexo IV C) y se le hizo una prueba de estabilidad en el agua (Anexo IV D).

Los resultados del análisis de la composición de la dieta así como su estabilidad en agua están presentados en la Tabla V.

Tabla V. Composición proximal y estabilidad en agua de la dieta experimental del capítulo I. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar, a la excepción del extracto libre de nitrógeno que está mostrado como promedio únicamente.

Análisis	
Humedad ¹	6.81 \pm 0.06
Proteína ²	39.58 \pm 0.09
Extracto etéreo ²	8.33 \pm 0.06
Fibra cruda ²	1.12 \pm 0.09
Cenizas ²	7.14 \pm 0.00
Extracto libre de nitrógeno ²	43.83
Estabilidad en agua ¹	90.2 \pm 0.15

¹(%); ²(g 100g⁻¹ materia seca)

I. 1. 3. Estrés crónico de manipulación

El estímulo estresor se aplicó únicamente a los camarones de los grupos “estrés” después de la aclimatación de los organismos a sus sistemas de cultivo. El estímulo consistió en capturarlos con una red de mano y ponerlos en una bolsa de tela dentro de una cubeta con agua. La bolsa se levantaba de la cubeta y era sacudida cinco veces y enseguida los camarones se regresaban a su tanque (Figura 9). El estrés fue aplicado una vez al día (9:30 am) durante 4 semanas y posteriormente se procedió al muestreo en ambos sistemas de tanques. Cuando un tanque presentaba más de 30% de organismos recién mudados, no se aplicaba el estrés. Se tuvo cuidado de no perturbar a los animales de los grupos “control”.

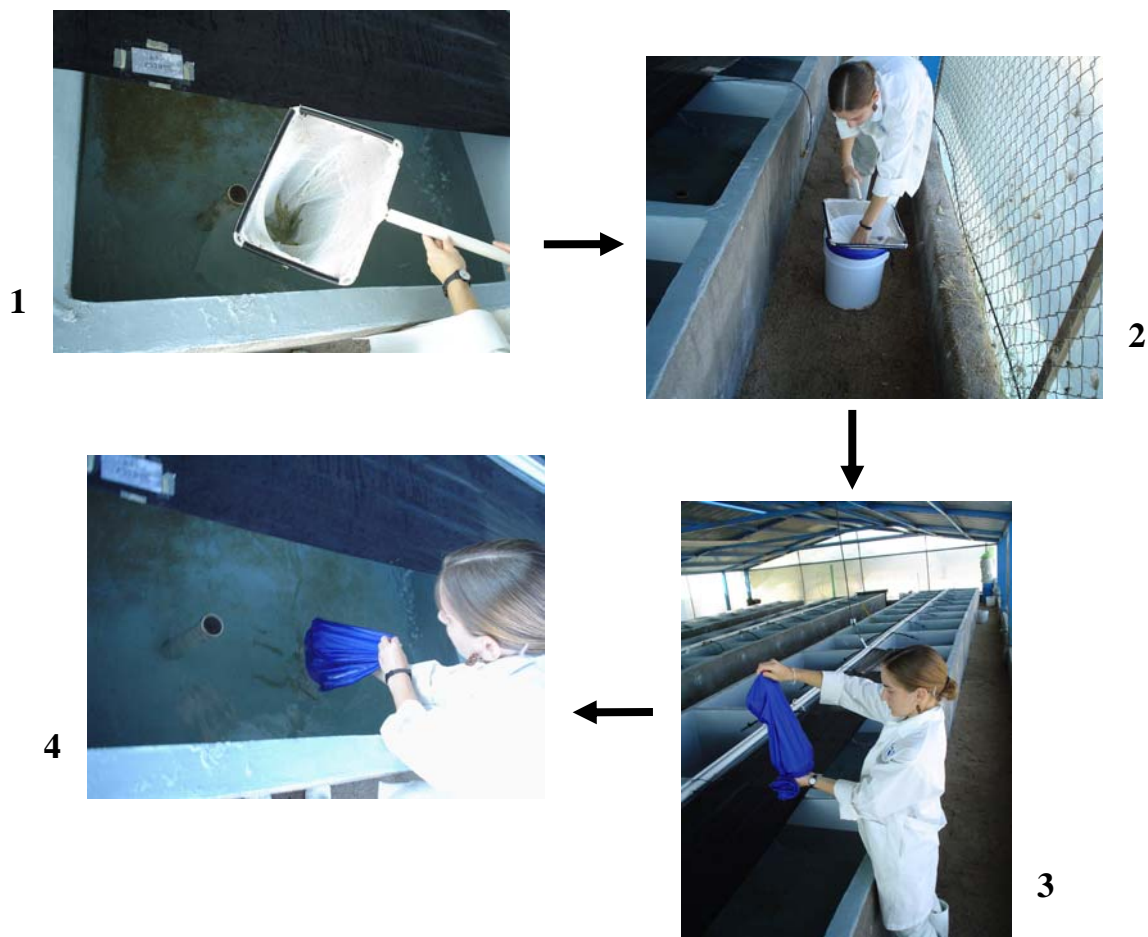


Figura 9. Secuencia del estímulo estresor aplicado en los dos sistemas experimentales. 1- captura de los camarones con una red; 2- transferencia de los animales en una bolsa de tela dentro de una cubeta con agua; 3- extracción de la bolsa para ser sacudida 5 veces; 4- retorno de los camarones a sus tanques.

I. 2. Muestreo de los camarones

I. 2. 1. Variables metabólicas

Para la respuesta metabólica, se extrajo hemolinfa (aproximadamente 300 μ l) de los sacos hemolinfáticos ventrales de los camarones (Figura 10) con jeringas previamente enjuagadas con un anticoagulante conteniendo 5% de oxalato de sodio (Mendoza, 1992). La hemolinfa fue centrifugada a $1350 \times g$ por 10 minutos a 4°C y el plasma fue colocado en tubos “Eppendorff” para análisis posteriores. Los organismos fueron pesados (peso final), y se congelaron el cefalotórax y el primer segmento abdominal a -70°C para futuros análisis. Se determinó también el estadio de muda de cada organismo observando al microscopio las setas de los urópodos (Robertson *et al.*, 1987). Solo se seleccionaron para el muestreo aquellos que se encontraban en intermuda o premuda temprana. El número de animales muestreado para las variables metabólicas se detalla en la Tabla VI

Tabla VI Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables metabólicas en el capítulo I.

	Control	Estrés
Tanques de plástico	10	10
Tanques de concreto	22	23



Figura 10. Extracción de hemolinfa de los sacos ventrales de un camarón.

I. 2. 2. Variables inmunes

Para medir la respuesta inmune de los organismos al final del experimento, se utilizaron animales distintos a los usados para las variables metabólicas. Se extrajo hemolinfa (aproximadamente 400 μ l) a partir de los sacos hemolinfáticos, con jeringas conteniendo previamente 0.5 ml de una solución anticoagulante que contenía EDTA (Vargas-Albores *et al.*, 1993) y enseguida las muestras fueron procesadas. Se registró el peso (peso final), y se congeló el cefalotórax y el primer segmento abdominal a -70°C para análisis posteriores. Se determinó también el estadio de muda de cada animal para considerar en el muestreo solamente aquellos que se encontraban en intermuda o premuda temprana. El número de animales muestreados para las variables inmunes se detalla en la Tabla VII.

Tabla VII. Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables inmunes en el capítulo I.

	Control	Estrés
Tanques de plástico	9	11
Tanques de concreto	15	15

I. 3. Análisis de laboratorio

I. 3. 1. Análisis bioquímicos

El mismo día del muestreo, se determinó en la hemolinfa la concentración de hemocianina y proteínas totales. En días posteriores se determinaron la concentración de lípidos totales, triacilglicéridos, colesterol, glucosa y lactato. Los diferentes protocolos utilizados para la determinación de estas variables se muestran en el Anexo V.

A partir del cefalotórax y del primer segmento abdominal previamente congelados, se extrajeron 0.1 g de hepatopáncreas y 0.1 g de músculo. Cada tejido fue liofilizado durante 24 horas, pesado, triturado y homogenizado en 1 ml de solución isotónica para crustáceos (450 mM NaCl – Sigma, S-9888, St. Louis, MO, USA; 10mM KCl – Sigma, P-5405, St. Louis, MO, USA). En hepatopáncreas, se determinaron las concentraciones de lactato, proteínas, carbohidratos totales, lípidos totales y triacilglicéridos. En músculo, se determinaron las concentraciones de lactato, proteínas y carbohidratos totales. Los protocolos utilizados para la determinación de estas variables se muestran en el Anexo VI.

I. 3. 2. Análisis de componentes del sistema de defensa

El mismo día del muestreo, se cuantificó la producción de anión superóxido (Anexo VII A) y se realizó un conteo total de hemocitos (Anexo VII B). Posteriormente, se

determinó la actividad de la SOD en músculo y hepatopáncreas midiendo la reducción del citocromo C a 550 nm (McCord y Fridovich, 1969) (Anexo VII C). Para esta técnica se disectaron el hepatopáncreas y el músculo sobre una placa de metal fría y se tomó un fragmento de 0.1 g de cada tejido. Estos fragmentos fueron homogeneizados en un buffer fosfato (50 mM K_2HPO_4 – Sigma, P-8281, St. Louis, MO, USA; 50 mM KH_2PO_4 – Sigma, P-5379, St. Louis, MO, USA) durante 10 segundos y centrifugados a $12,000 \times g$ durante 12 minutos a $4^\circ C$. El sobrenadante fue guardado a $-70^\circ C$ hasta proceder al análisis. Se determinó también la concentración de proteínas solubles de cada muestra para expresar la actividad de la SOD en $U\ mg^{-1}$ de proteína soluble.

I. 4. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA™ (versión 5.5; StatSoft, Tulsa, OK, USA) utilizando un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Las variables metabólicas e inmunes fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía (entre estrés y control) para cada sistema experimental. Previamente se verificaron la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas. Cuando una de estas condiciones no era satisfecha, los datos fueron transformados (Sokal y Rohlf, 1995) y nuevamente probados. En caso de no cumplir estos supuestos, las variables fueron analizadas con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

No se compararon estadísticamente las variables entre los dos sistemas experimentales debido a múltiples diferencias que no pudieron ser controladas durante el

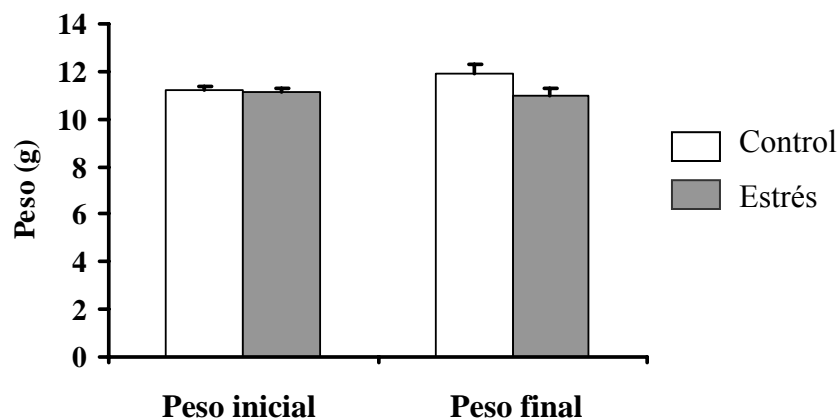
experimento. Sin embargo, algunas observaciones interesantes entre ambos sistemas se mencionan en los resultados y la discusión.

I. 5. Resultados

I. 5. 1. Desempeño biológico

Al inicio del experimento, los camarones de los grupos control y estrés de los tanques de plástico y de los de concreto no mostraron diferencias significativas en su peso. Tampoco se observaron diferencias significativas en el peso al final del experimento para los dos grupos experimentales en tanques de plástico y de concreto (Figuras 11A y 12A). En ambos sistemas, la diferencia entre el peso final e inicial mostró un crecimiento mínimo, pero no significativo para los camarones de los grupos control, y no se detectó crecimiento para los organismos estresados. La supervivencia fue significativamente menor para los organismos sometidos al estrés en los tanques de concreto, mientras que en los tanques de plástico no se observó esta diferencia (Figuras 11B y 12B). Durante la aplicación del estímulo estresor en los tanques de plástico, el consumo de alimento de los camarones del grupo estrés fue menor que el de los camarones de control (Figura 13A). Además, se observó una menor frecuencia de mudas para estos mismos camarones aunque esta variable no resultó estadísticamente significativa ($P = 0.12$; Figura 13B).

A) Peso inicial y final



B) Supervivencia

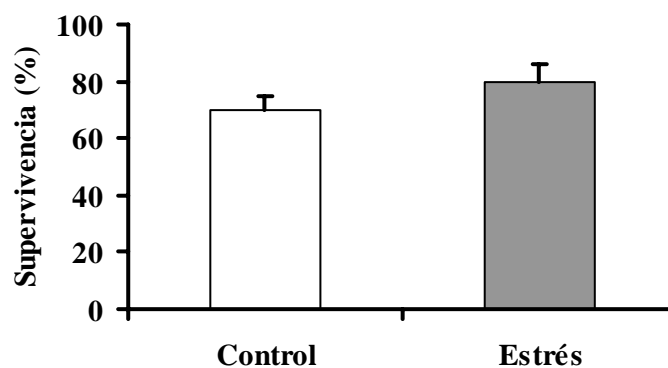
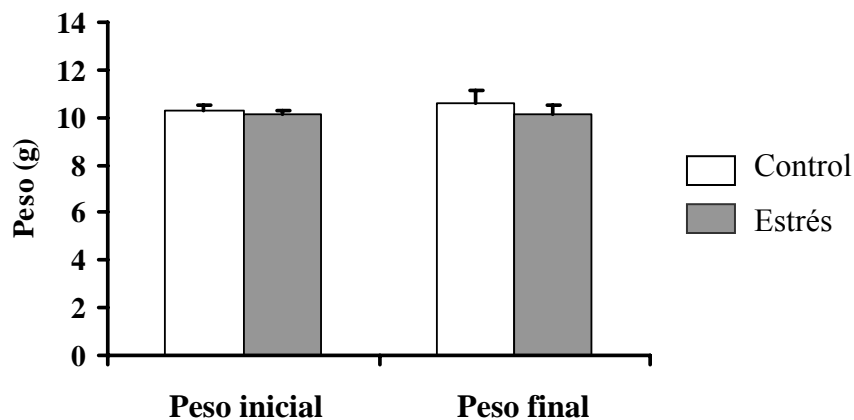


Figura 11. Peso y supervivencia determinados en juveniles de camarón blanco en tanques de plástico. Los datos están presentados como promedio \pm error estándar. Para el peso inicial, el número de camarones fue de $n = 30$; para el peso final, el número de camarones fue de $n = 19$ y $n = 21$ para los grupos control y estrés respectivamente; para la supervivencia, el número de réplicas para cada tratamiento fue de $n = 5$.

A) Peso inicial y final



B) Supervivencia

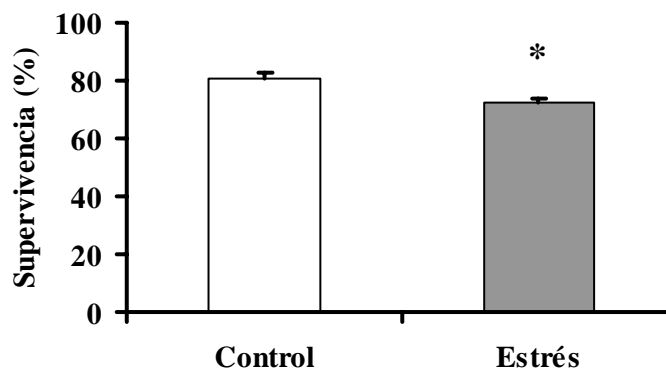
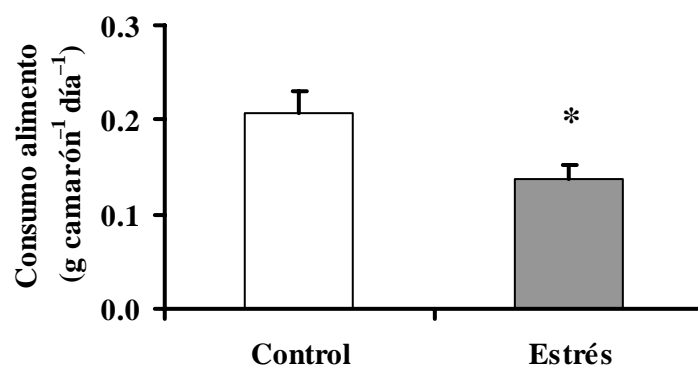


Figura 12. Peso y supervivencia determinados en juveniles de camarón blanco en tanques de concreto. Los datos están presentados como promedio \pm error estándar. Un asterisco indica una diferencia significativa entre ambos grupos ($P \leq 0.05$). Para el peso inicial, el número de camarones fue de $n = 90$; para el peso final, el número de camarones fue de $n = 37$ y $n = 38$ para los grupos control y estrés respectivamente; para la supervivencia, el número de réplicas para cada tratamiento fue de $n = 3$.

A) Consumo de alimento



B) Ocurrencia de mudas

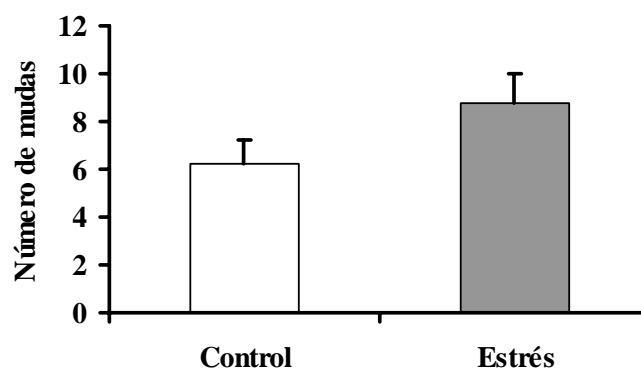


Figura 13. Consumo de alimento y ocurrencia de mudas de los camarones de los grupos control y estrés en los tanques de plástico durante el periodo experimental. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar. Un asterisco indica una diferencia significativa entre ambos grupos ($P \leq 0.05$). Para el consumo de alimento y la ocurrencia de mudas, el número de réplicas para cada tratamiento fue de $n = 5$.

I. 5. 2. Variables metabólicas

En los tanques de plástico, los camarones del grupo estrés mostraron una concentración de glucosa significativamente mayor en la hemolinfa comparada con los camarones del grupo control, mientras que las otras variables no mostraron diferencias significativas (Tabla VIII). En hepatopáncreas, la concentración de lípidos totales fue casi el doble en los organismos del grupo estrés en comparación con el grupo control y una tendencia similar pero no significativa ($P = 0.21$) se observó para los triacilglicéridos. En contraste, los carbohidratos mostraron una concentración significativamente menor en el grupo de camarones expuestos al estrés por manipulación. No se encontraron diferencias significativas en el resto de las variables medidas en músculo.

En tanques de concreto, los camarones del grupo estrés presentaron en hemolinfa una concentración de proteínas totales, triacilglicéridos y lípidos totales significativamente menor comparada con los camarones del grupo control (Tabla IX). De la misma manera, la concentración de carbohidratos en músculo fue estadísticamente menor en los camarones sometidos a estrés. En este mismo tejido no se observaron diferencias significativas para las concentraciones de lactato y proteínas totales. En hepatopáncreas, las variables medidas no resultaron ser significativamente diferentes entre los dos grupos experimentales.

En general, la concentración de las variables metabólicas analizadas en la hemolinfa y hepatopáncreas fueron mayores en los camarones mantenidos en el sistema de concreto.

Tabla VIII. Variables metabólicas medidas en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo de camarón blanco en tanques de plástico (grupo control y grupo estrés). Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.

	Grupo control (<i>n</i> = 10)	Grupo estrés (<i>n</i> = 10)
Hemolinfa		
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	54.6 \pm 5.7	62.0 \pm 4.8
Proteínas totales(mg ml ⁻¹)	90.8 \pm 5.5	95.5 \pm 4.5
Triacilglicéridos (mg dl ⁻¹)	35.2 \pm 5.4	34.4 \pm 3.0
Colesterol (mg dl ⁻¹)	14.5 \pm 3.5	14.9 \pm 1.6
Lípidos totales (mg dl ⁻¹)	205 \pm 45.6	180 \pm 22.4
Lactato (mg dl ⁻¹)	3.9 \pm 0.5	4.2 \pm 0.4
Glucosa (mg dl ⁻¹)	8.5 \pm 3.6	12.1 \pm 1.3*
Hepatopáncreas^Δ		
Proteínas totales(mg g ⁻¹)	262 \pm 15.5	243 \pm 17.0
Triacilglicéridos (mg g ⁻¹)	41.2 \pm 6.5	54.5 \pm 7.8
Lípidos totales (mg g ⁻¹)	198 \pm 36.7	348 \pm 49.0*
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	91.3 \pm 10.0	56.3 \pm 4.9*
Lactato (mg g ⁻¹)	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0
Carotenoides (μg g ⁻¹)	480 \pm 161	471 \pm 104
Músculo^Δ		
Proteínas totales(mg g ⁻¹)	544 \pm 19.5	532 \pm 18.7
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	31.4 \pm 5.9	40.3 \pm 8.7
Lactato (mg g ⁻¹)	2.8 \pm 0.4	2.7 \pm 0.2

Un asterisco indica diferencias significativas entre ambos grupos ($P \leq 0.05$). ^ΔLos resultados están dados en peso seco.

Tabla IX. Variables metabólicas medidas en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo de camarón blanco en tanques de concreto (grupo control y grupo estrés). Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.

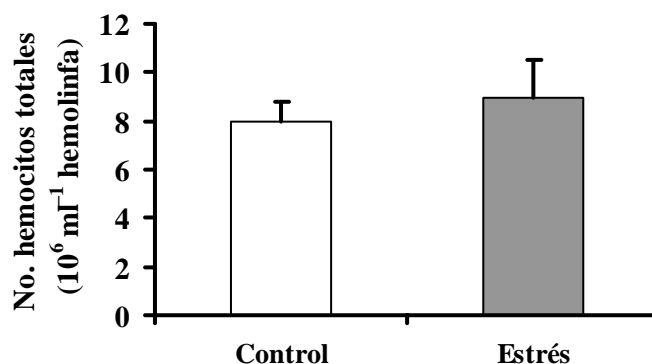
	Grupo control (<i>n</i> = 22)	Grupo estrés (<i>n</i> = 23)
Hemolinfa		
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	83.0 \pm 5.6	72.7 \pm 5.2
Proteínas totales (mg ml ⁻¹)	122 \pm 2.7	111 \pm 3.1*
Triacilglicéridos (mg dl ⁻¹)	49.7 \pm 3.5	39.5 \pm 2.7*
Colesterol (mg dl ⁻¹)	21.1 \pm 2.2	17.4 \pm 1.5
Lípidos totales (mg dl ⁻¹)	297 \pm 24.6	207 \pm 13.5*
Lactato (mg dl ⁻¹)	4.2 \pm 0.4	3.6 \pm 0.4
Glucosa (mg dl ⁻¹)	16.9 \pm 2.8	17.1 \pm 2.0
Hepatopáncreas^Δ		
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	302 \pm 59.0	263 \pm 15.5
Triacilglicéridos (mg g ⁻¹)	57.9 \pm 8.0	74.6 \pm 9.2
Lípidos totales (mg g ⁻¹)	346 \pm 46.6	360 \pm 53.8
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	68.9 \pm 9.2	66.0 \pm 5.5
Lactato (mg g ⁻¹)	0.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0
Carotenoides (μg g ⁻¹)	634 \pm 122	660 \pm 122
Músculo^Δ		
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	541 \pm 27.8	528 \pm 22.7
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	51.7 \pm 5.7	35.1 \pm 5.1*
Lactato (mg g ⁻¹)	3.9 \pm 0.3	3.5 \pm 0.2

Un asterisco indica diferencias significativas entre ambos grupos ($P \leq 0.05$). ^ΔLos resultados están dados en peso seco.

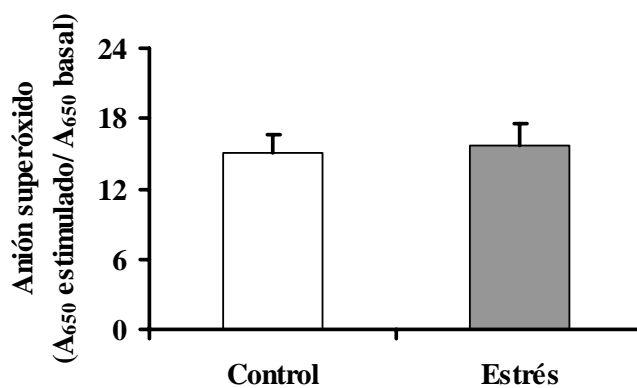
I. 5. 3. Variables inmunes

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos sistemas experimentales, entre los camarones de control o los sometidos a estrés (Figuras 14 y 15). Los hemocitos fueron casi dos veces más abundantes en la hemolinfa de camarones en los tanques de plástico, mientras que la producción de anión superóxido fue 50% superior en la hemolinfa de camarones en tanques de concreto. La actividad de la SOD medida en el hepatopáncreas fue similar en los dos sistemas experimentales. No se reportan los resultados de SOD en el músculo porque solamente se detectó dicha actividad en algunas muestras.

A) Número de hemocitos totales



B) Producción anión superóxido



C) Actividad SOD en hepatopáncreas

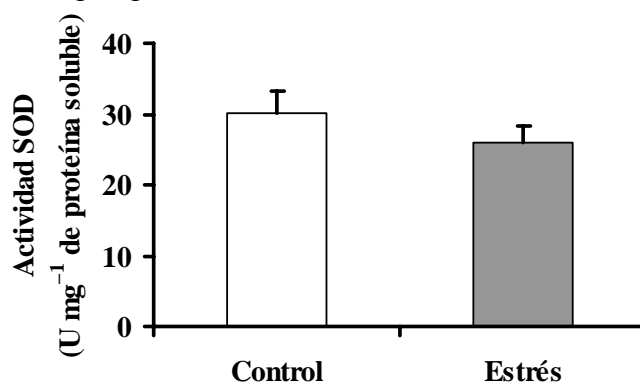
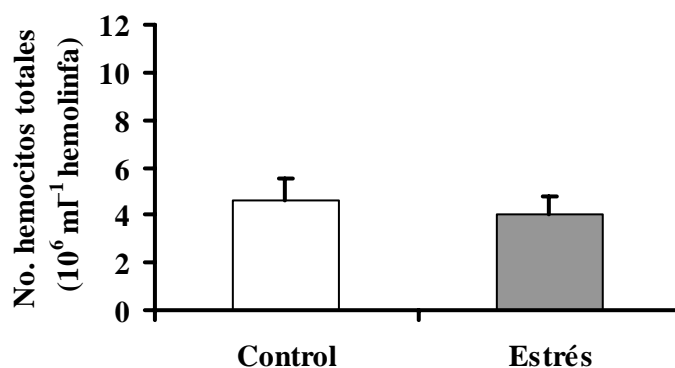
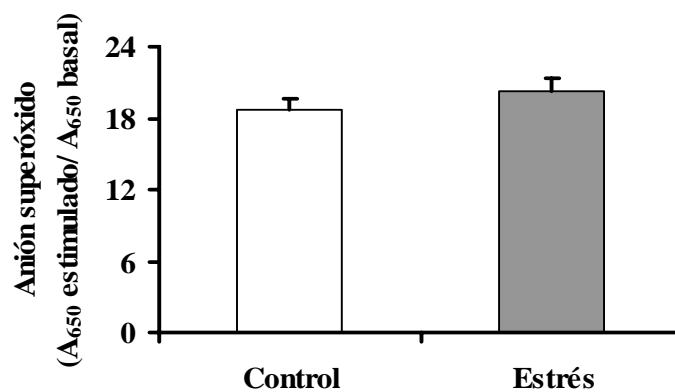


Figura 14. Variables inmunes medidas en juveniles de camarón blanco en tanques de plástico. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Un asterisco indica diferencias significativas entre ambos grupos ($P \leq 0.05$). El número de camarones utilizado para cada tratamiento está detallado en la Tabla VII.

A) Número de hemocitos totales



B) Producción anión superóxido



C) Actividad SOD en hepatopáncreas

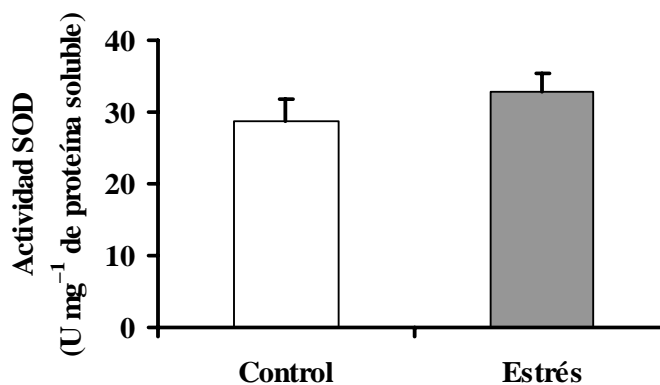


Figura 15. Variables inmunes medidas en juveniles de camarón blanco en tanques de concreto. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Un asterisco indica diferencia significativa entre ambos grupos ($P \leq 0.05$). El número de camarones utilizado para cada tratamiento está detallado en la Tabla VII.

I. 6. Discusión

I. 6. 1. Efecto del estrés sobre el desempeño de los camarones

El estrés crónico de manipulación tuvo algunos efectos negativos sobre los camarones. En el sistema de tanques de concreto, los camarones sometidos al estrés tuvieron una supervivencia significativamente menor y se observó un ligero decremento en su peso final. La dificultad de registrar el consumo de alimento en este sistema experimental no permitió confirmar si el decremento del peso final de los camarones estaba relacionado con un menor consumo de alimento o con una menor capacidad de utilizar la energía del alimento para el crecimiento. La incapacidad de registrar el número de mudas en el sistema de tanques de concreto, tampoco permitió evaluar si el peso final pudo ser afectado por la frecuencia de mudas. En los tanques de plástico, los camarones del grupo estrés mostraron menor consumo de alimento que los del grupo control. Por lo anterior, el estrés de manipulación parece afectar algunos factores del crecimiento. Sin embargo, esto debe ser confirmado bajo condiciones experimentales a largo plazo con estadios donde el camarón presenta tasas de crecimiento más altas y midiendo variables como la tasa de conversión alimenticia y la frecuencia de muda, entre otros.

I. 6. 2. Respuesta metabólica

Las diferencias que se observaron en las variables metabólicas del sistema de tanques de concreto y las del sistema de tanques de plástico pueden deberse a la presencia de alimentos naturales y a una menor incidencia de perturbaciones externas. En los tanques de plástico el agua era filtrada a 1 μm e irradiada por UV. Por lo contrario, en los tanques

de concreto, el agua de recambio era filtrada a 15 μm lo que permitía el paso de organismos fito- y zooplanctónicos, representando una fuente adicional de alimento. Otoshi *et al.* (2001) observaron que el crecimiento de los camarones se incrementa cuando están cultivados en agua que contiene bacterias, microalgas y detritus, los cuales aportan proteínas y vitaminas. Guzmán *et al.* (2001) señalaron también que las enzimas digestivas de estos microorganismos pueden incrementar la asimilación de los alimentos que ingieren los camarones, lo cual se refleja en los metabolitos de la hemolinfa. Además, en los tanques de concreto, los camarones tenían también un flujo de agua continuo asegurando menos disturbios (por rutina de mantenimiento) y una calidad de agua más constante. Estas diferencias encontradas entre ambos sistemas experimentales resultan interesantes, porque demuestran la importancia de las condiciones ambientales sobre la capacidad de respuesta de *L. vannamei* sometido a un estrés crónico. Para un estudio posterior, los tanques de concreto parecen ser más adecuados para determinar las respuestas a un estrés crónico de manipulación, aunque este sistema no facilitó la evaluación del consumo de alimento de los camarones, ni permitió un riguroso control sobre las variables ambientales. Sin embargo, el flujo continuo de agua evitó la necesidad de hacer recambios de agua manualmente todos los días, los cuales representaban un estímulo estresor adicional para los camarones.

Un aumento de la glucosa en la hemolinfa de los camarones peneidos como respuesta al estrés es bien conocido y fue demostrado en relación a muestreos repetidos de hemolinfa (Racotta y Palacios, 1998), a la exposición a formol (van Ham y Hall, 1998), a la emersión o hipoxia (Hall y van Ham, 1998) y a la exposición a altas concentraciones de amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Mugnier y Justou, 2004). En este estudio, las

concentraciones de glucosa y lactato en la hemolinfa fueron similares o menores que los niveles basales reportados para *L. vannamei* bajo condiciones experimentales cercanas a las del presente trabajo (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Racotta *et al.*, 2002). El ligero aumento (de 8.5 hasta 12.1 mg dl⁻¹) de la glucosa en los camarones sometidos al estrés en los tanques de plástico no alcanzó los niveles relativos (más del doble de los valores basales) o absolutos (más de 30 mg dl⁻¹) generalmente reportados para camarones en situación de estrés agudo (Hall y van Ham, 1998; Racotta y Palacios, 1998; van Ham y Hall, 1998; Racotta *et al.*, 2002). Bajo condiciones de estrés crónico, ningún aumento significativo o incluso una disminución de glucosa ha sido reportada para *Penaeus monodon* mantenidos cuatro semanas a altas densidades (Hall y van Ham, 1998) y para *L. setiferus* silvestres mantenidos siete días bajo condiciones de laboratorio (Sánchez *et al.*, 2001) o expuestos a una alta temperatura durante diez días. Sin embargo, un aumento de glucosa en hemolinfa fue reportada en *L. vannamei* después de una exposición a la hipoxia durante dos semanas (Racotta *et al.*, 2002). Todo lo anterior nos indica que el aumento en las concentraciones de glucosa durante un estrés crónico puede no ser tan pronunciado como el que ocurre durante un estrés agudo. De la misma manera, Pickering y Pottinger (1989) encontraron solamente un ligero aumento del cortisol en el plasma de salmónidos (10 ng ml⁻¹) sometidos a un estrés crónico durante cuatro semanas. Dichos niveles de cortisol pueden ser considerados como los que presentan los peces no estresados (0-5 ng ml⁻¹), ya que los salmónidos bajo condiciones de estrés mostraron niveles mucho más altos (40-200 ng ml⁻¹).

El aumento del lactato en la hemolinfa resulta de la activación del metabolismo anaerobio, lo cual ocurre durante situaciones de estrés particulares como una inyección de serotonina (Racotta y Palacios, 1998), hipoxia (Racotta *et al.*, 2002), o la actividad física inducida por persecución (Racotta *et al.*, 2003). En el presente trabajo, la producción de lactato no fue promovida por el estrés de manipulación. Por lo mismo, la relevancia del lactato como indicador de estrés crónico es cuestionada en este estudio. Otros autores (Racotta y Palacios, 1998; Mugnier y Justou, 2004) también señalaron este aspecto debido a que no hubo efecto o incluso disminuyó durante una exposición a amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Mugnier y Justou, 2004), muestreos repetidos (Racotta y Palacios, 1998), condiciones de cautividad (Sánchez *et al.*, 2001) o exposición a temperatura alta (Pascual *et al.*, 2003b).

Un decremento de las proteínas totales en hemolinfa, como fue observado en los tanques de concreto, fue reportado en camarón en diversas condiciones de estrés (Chen *et al.*, 1994; Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Sánchez *et al.*, 2001; Perazzolo *et al.*, 2002). La hemocianina es la principal proteína circulante en crustáceos, representando 60-97% de las proteínas plasmáticas en *L. vannamei* (Pascual *et al.*, 2003a). En el presente estudio, el decremento en proteínas totales fue acompañado por un decremento no significativo de la hemocianina. Tres hipótesis pueden considerarse para el decremento de proteínas durante condiciones estresantes: la primera considera que las proteínas totales circulantes, y en particular la hemocianina, pueden ser utilizadas como reserva energética bajo situaciones de incremento de demanda de energía como es el estrés (Racotta y Palacios, 1998). La segunda hipótesis se basa en la función bien conocida de los

aminoácidos libres para el balance osmótico en los medios marinos o hipersalinos, los cuales se obtienen a partir de la hidrólisis de proteínas tanto tisulares como circulantes en el camarón (Dalla Via, 1986; Marangos *et al.*, 1989). Durante condiciones de estrés, la capacidad osmoreguladora del camarón es alterada y entonces la osmolaridad de la hemolinfa se acerca a la salinidad del agua de mar (Lignot *et al.*, 2000). Para contrarrestar el incremento resultante en la concentración de iones, es posible que hayan incrementado los aminoácidos libres, aunque desgraciadamente estos no fueron medidos en el presente trabajo. Un decremento de las proteínas totales y de la hemocianina en la hemolinfa durante una exposición al amonio, junto con un aumento de la concentración de amino ácidos libres fue explicado como ajustes osmoreguladores en condiciones de estrés (Chen *et al.*, 1994). La tercer hipótesis está relacionada con las proteínas plasmáticas que participan en la respuesta inmune, tales como las que están involucradas en el reconocimiento de los microorganismos invasores (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000), en el proceso de coagulación y en el sistema proFO (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). También se incluyen dentro de estas proteínas plasmáticas a los péptidos antimicrobianos o “peneidinas” (Bachère *et al.*, 2000) y aglutininas (Vargas-Albores, 1995). Perazzolo *et al.* (2002) reportaron un decremento de las proteínas totales plasmáticas junto con el decremento de otros indicadores de la respuesta inmune en el camarón *Farfantepenaeus paulensis* varios días después de haber ablacionado unilateralmente el pedúnculo ocular de hembras y extirpado el espermatóforo de machos. En el presente estudio, las tres hipótesis podrían explicar los resultados obtenidos. De cualquier manera, y tal como lo señalaron

Perazzolo *et al.* (2002), los niveles de proteína son buenos indicadores para monitorear la salud de los camarones.

La disminución de lípidos totales, y particularmente, de los triacilglicéridos en la hemolinfa de los camarones de los tanques de concreto, indica probablemente su utilización para satisfacer las demandas metabólicas, como fue previamente sugerido durante un estrés agudo (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000).

Respecto a la utilización de reservas para energía, los camarones sometidos al estrés en el sistema de concreto parecen haber utilizado los carbohidratos del músculo, mientras que los camarones del grupo estrés en el sistema de plástico, los carbohidratos del hepatopáncreas. Estos resultados se pueden explicar por las diferencias antes mencionadas (presencia de alimentos naturales y menor incidencia de perturbaciones externas) entre los dos sistemas. Particularmente, se esperaba una disminución en lípidos del hepatopáncreas; sin embargo, se observó una mayor concentración en el hepatopáncreas de los camarones sometidos al estrés en los tanques de plástico. Eso puede ser debido a una disrupción en el metabolismo lipídico de este órgano ocasionado por el estrés, de manera semejante a la acumulación de las grasas saturadas en el hígado del ser humano (Singer y Richter-Heinrich, 1991; Coppack *et al.*, 1994).

I. 6. 3. Respuesta inmune

La falta de significancia en las diferencias entre las variables inmunes (a excepción de las proteínas totales) sugiere que el sistema inmune de los camarones no fue afectado por la manipulación aplicada diariamente. Bajo condiciones de estrés, se encuentra en

crustáceos generalmente un decremento del conteo total de hemocitos (CTH). Sánchez *et al.* (2001) reportaron una disminución del 43% en el CTH de machos adultos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 7 días a 27°C, comparado con animales recién capturados. Un decremento significativo del CTH fue también observado después de la exposición de *P. stylirostris* (Le Moullac *et al.*, 1998) y *Macrobrachium rosenbergii* (Cheng *et al.*, 2002) en condiciones de hipoxia. Perazzolo *et al.* (2002) reportaron también un CTH menor en *F. paulensis* mantenido a baja salinidad, así como un decremento del 56% del CTH en hembras ablacionadas y del 63% en machos con el espermatóforo extirpado. En el presente trabajo, el periodo de estrés fue mantenido 30 días y puede ser una explicación a la falta de efecto sobre el CTH. En los estudios arriba mencionados, a la excepción del trabajo de Perazzolo *et al.* (2002) donde las condiciones hiposalinas fueron mantenidas durante 28 días, los CTH fueron realizados máximo una semana después de que el estímulo estresante fue aplicado, independientemente si éste se mantenía o se aplicaba únicamente una vez. Por lo anterior, una adaptación o aclimatación a las condiciones de estrés pudo haber ocurrido en el presente experimento. Durante la exposición a una temperatura alta (33°C) por 10 días, Pascual *et al.* (2003b) observaron una disminución del CTH en *L. setiferus* durante los primeros 6 días, y un regreso a niveles normales posteriormente. Por otro lado, la intensidad o la naturaleza del estímulo estresor que se aplicó pudieron ser demasiado ligeras para inducir un efecto en el CTH, ya que los agentes estresantes aplicados en los trabajos mencionados anteriormente eran muy adversos o traumatizantes. Por último, la gran variabilidad de los niveles de CTH provocados por cambios ambientales no controlables pudieron enmascarar las pequeñas diferencias causadas por el estrés.

La producción de anión superóxido ha sido monitoreada en diversos estudios donde se estimula directamente por varios patógenos (Song y Hsieh, 1994; Muñoz *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002). Liu y Chen (2004) observaron un incremento de la producción de anión superóxido en *L. vannamei* cultivado en altas concentraciones de amonio (de 2 a 7 días). Sin embargo, la exposición a una hipoxia severa (1 mg ml^{-1}) durante 24 horas disminuyó esta misma producción, aparentemente junto con un decremento en CTH (Le Moullac *et al.*, 1998). En el presente estudio, el estrés crónico no afectó significativamente la producción de anión superóxido. Los efectos del estrés sobre este índice inmunológico en camarones peneidos han sido principalmente enfocados a cambios ambientales, por lo cual no es posible comparar en nuestro caso, si la duración o intensidad del estrés por manipulación fue adecuada para observar un efecto.

Respecto a la SOD, Lui y Chen (2004) reportaron un decremento de la actividad de esta enzima después de la exposición de *L. vannamei* a concentraciones altas de amonio. En el presente trabajo, no se observó un efecto significativo del estrés de manipulación sobre la actividad de la SOD en el hepatopáncreas y, junto con el resultado de la producción de anión superóxido en hemolinfa, indican que el balance oxidante-antioxidante en los camarones no fue alterado significativamente a pesar del estrés aplicado.

CAPÍTULO II

**Respuesta inmune de *L. vannamei* alimentado con dietas
que contienen diferentes concentraciones de HUFA**

El objetivo de este capítulo fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de HUFA en la dieta sobre la respuesta inmune del camarón blanco, particularmente sobre la HDL-BGBP.

II. 1. Metodología

II. 1. 1. Dietas experimentales

Para cumplir con el objetivo, se diseñaron tres dietas isocalóricas con aproximadamente 35% de proteínas y 8% de lípidos. La diferencia entre estas tres dietas consistió en el contenido de HUFA, el cual fue bajo, medio y alto. Para obtener dietas con diferentes niveles de HUFA, se utilizaron emulsiones lipídicas de 0, 30 y 50% de HUFA (ICES Standard Reference Emulsion, Universidad de Ghent, Gent, Bélgica; ICES, 1997). Los procedimientos de la formulación y fabricación están detallados en el Anexo VIII (A y B). En este capítulo, se hablará de dietas baja, media o alta en HUFA que corresponden a las emulsiones de 0, 30 o 50% de HUFA utilizadas, respectivamente. Las tres dietas fueron elaboradas en forma de pelet y para cada una se analizó su composición química proximal (Anexo VIII C), su estabilidad en el agua (Anexo VIII D), así como su perfil de ácidos grasos (Anexo IX). Se hicieron pruebas preliminares para estandarizar los análisis de ácidos grasos en las muestras de alimento ya que estas presentaban un bajo contenido de agua (Anexo IX).

Los resultados de la composición proximal de las tres dietas experimentales se muestran en la Tabla X.

Tabla X. Composición proximal y estabilidad en agua de las dietas baja, media y alta en HUFA. Los resultados se presentan como promedio \pm desviación estándar, a la excepción del extracto libre de nitrógeno que está mostrado como promedio únicamente.

Análisis	Dieta baja en HUFA	Dieta media en HUFA	Dieta alta en HUFA
Humedad ¹	11.01 \pm 0.53	10.49 \pm 0.51	9.57 \pm 0.45
Proteína ²	34.36 \pm 1.05	35.28 \pm 1.00	34.81 \pm 1.05
Extracto etéreo ²	7.55 \pm 0.68	6.66 \pm 0.70	7.29 \pm 0.53
Fibra cruda ²	2.22 \pm 0.20	2.31 \pm 0.26	2.30 \pm 0.21
Cenizas ²	8.45 \pm 0.53	8.83 \pm 0.49	9.21 \pm 0.57
Extracto libre de nitrógeno ²	47.42	46.92	46.39
Estabilidad en agua ¹	85.5 \pm 0.20	86.3 \pm 0.19	85.6 \pm 0.17

¹(%); ²(g 100g⁻¹ materia seca)

II. 1. 2. Diseño experimental

Camarones de aproximadamente 20 g (peso inicial), cultivados en el sistema de concreto descrito en el capítulo I fueron seleccionados y repartidos en nueve tanques a una densidad de 15 organismos por tanque (aproximadamente 20 organismos por m²). La temperatura durante el experimento fue mantenida a 25 \pm 2°C. Se usó un flujo de agua constante para tener un recambio de 200% diario y el fotoperíodo fue natural (aproximadamente 11.5 horas luz y 12.5 horas oscuridad). Se usaron tres réplicas para cada dieta y los camarones fueron alimentados dos veces al día (9:00 am – 6:00 pm) a saciedad aparente (aproximadamente 3.5% de la biomasa). Cada mañana, se registraron el número de mudas, organismos muertos y alimento no consumido. El experimento tuvo una duración de 24 días, al cabo de los cuales los organismos fueron sometidos a un ayuno de 24 h antes de ser muestreados.

II. 2. Muestreo de los camarones

II. 2. 1 Variables inmunes y composición de ácidos grasos en músculo

El muestreo se hizo en dos submuestreos: en el primero, se extrajo hemolinfa a partir de los sacos hemolinfáticos ventrales de los camarones para realizar el CTH y medir la capacidad de producción de anión superóxido de los hemocitos. También se guardaron el cefalotórax y el primer segmento abdominal para determinar la actividad de la SOD en estos dos tejidos. Los procedimientos para la obtención de las muestras fueron mencionados en el capítulo I. Para el segundo submuestreo, se colectó hemolinfa con el fin de medir la concentración de la HDL-BGBP. La hemolinfa se obtuvo nuevamente de los sacos hemolinfáticos, de la misma manera que en la etapa anterior. Una vez extraída, la hemolinfa se colocó en tubos de vidrio para ser centrifugada por 5 minutos a $800 \times g$ (5°C). El sobrenadante (plasma) fue transferido a microtubos y congelado a -70°C para posteriores análisis de la HDL-BGBP. Un fragmento de músculo (aproximadamente 0.1 g) fue también disectado del primer segmento abdominal con el fin de determinar la composición en ácidos grasos. Para ambos submuestreos, se utilizaron diferentes camarones y el número de ejemplares muestreados en cada uno se detalla en la Tabla XI. Se determinó el sexo, peso y estadio de muda de todos los camarones muestreados observando las setas de sus urópodos bajo un microscopio óptico (Robertson *et al.*, 1987).

Tabla XI. Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables inmunes y composición en ácidos grasos del músculo en el capítulo II.

	Dieta baja en HUFA	Dieta media en HUFA	Dieta alta en HUFA
1 ^{ero} submuestreo	6	6	6
2 ^{ndo} submuestreo			
- HDL-BGBP	9	9	9
- Ácidos grasos	6	6	6

II. 3. Análisis de laboratorio

II. 3. 1. Análisis de componentes inmunes y de ácidos grasos

El CTH, la producción de anión superóxido y la SOD fueron determinados el mismo día del muestreo como se describió en el Anexo VII. Para la determinación de la producción de anión superóxido, la absorbancia fue leída a 630 nm y no a 650 nm como se realizó en el capítulo I, ya que en este momento se consiguió el filtro de 630 nm indicado en el método de Song y Hsieh (1994).

La determinación de la HDL-BGBP en hemolinfa fue realizada por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) como se describe en el Anexo X (A). La técnica fue estandarizada utilizando el método indirecto, donde el anticuerpo marcado es una inmunoglobulina (IgG de cabra, anti-conejo y marcado con fosfatasa alcalina) que se une a un primer anticuerpo (anti-HDL-BGBP de camarón, policlonal) producido contra el antígeno de interés (HDL-BGBP). El primer anticuerpo fue generosamente proporcionado por la Dra. Yepiz, el cual fue obtenido a partir de conejos como se describió en Yepiz-Plascencia *et al.* (1998). Se determinó también la concentración en proteínas totales en el plasma de camarón con el fin de expresar los resultados de concentración de HDL-BGBP

por miligramo de proteína total. El protocolo utilizado para esta determinación se muestra en el Anexo X (B).

Se determinaron los ácidos grasos en el músculo de camarón después de haber separado los lípidos neutros de los polares, como se presenta en el Anexo XI.

II. 4. Análisis estadísticos

Primeramente, se verificaron la normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas de todas las variables (Sokal y Rohlf, 1995). Cuando estos supuestos no fueron satisfechos, los datos fueron transformados y nuevamente probados. Enseguida, las variables fueron analizadas con ANOVAs de una vía (tres niveles: dieta baja, media y alta en HUFA) o con pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. Este último caso se aplicó solamente cuando una variable no cumplía con las condiciones de normalidad y homogeneidad a pesar de las transformaciones. Para estos análisis, se utilizó el programa STATISTICA™ (versión 5.5; StatSoft, Tulsa, OK, USA). Adicionalmente, se hizo una prueba *t* de Student para comparar las diferencias entre el peso final y peso inicial de los camarones alimentados con cada una de las dietas experimentales. Esta prueba fue realizada con el programa Excel® XP (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Para todos los análisis se mantuvo un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

II. 5. Resultados

Las dietas presentaron una composición en ácidos grasos distinta entre sí (Tabla XII). La dieta baja mostró un contenido en HUFA de solamente 0.1%. En esta dieta, los

ácidos grasos mayoritariamente presentes eran los saturados. La dieta alta se caracterizó por tener 1.8% de HUFA mientras que la dieta media contenía 1% de HUFA. Las tres dietas se distinguían únicamente por su contenido de HUFA, ya que los resultados de los análisis proximales no fueron significativamente diferentes.

Tabla XII. Principales ácidos grasos ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ dieta) en las dietas baja, media y alta en HUFA. Los resultados (promedio \pm desviación estándar) están dados en peso húmedo.

	Dieta baja en HUFA (n = 3)	Dieta media en HUFA (n = 3)	Dieta alta en HUFA (n = 3)
<i>Ácidos grasos</i>			
12:0	1.43 \pm 0.04a	0.01 \pm 0.001b	--
14:0	0.70 \pm 0.03a	0.31 \pm 0.06b	0.15 \pm 0.01c
16:0	1.23 \pm 0.08	1.26 \pm 0.22	1.06 \pm 0.04
18:0	0.30 \pm 0.03	0.27 \pm 0.05	0.30 \pm 0.01
22:0	0.01 \pm 0.001b	0.02 \pm 0.004b	0.06 \pm 0.001a
16:1n-7	0.12 \pm 0.01b	0.35 \pm 0.06a	0.15 \pm 0.01b
18:1n-9	0.78 \pm 0.06	0.77 \pm 0.15	0.77 \pm 0.03
18:1n-7	0.09 \pm 0.01	0.06 \pm 0.11	0.07 \pm 0.07
20:1n-11	0.03 \pm 0.004c	0.05 \pm 0.01b	0.10 \pm 0.002a
18:2n-6	1.65 \pm 0.08	1.48 \pm 0.22	1.56 \pm 0.05
18:3n-3	0.20 \pm 0.01	0.20 \pm 0.03	0.21 \pm 0.01
20:4n-6	0.01 \pm 0.002c	0.04 \pm 0.01b	0.07 \pm 0.001a
20:5n-3	0.03 \pm 0.002c	0.53 \pm 0.10b	0.89 \pm 0.01a
21:4n-6	--	0.03 \pm 0.004	0.03 \pm 0.01
22:5n-3	--	0.01 \pm 0.003b	0.03 \pm 0.001a
22:6n-3	0.06 \pm 0.002c	0.39 \pm 0.08b	0.77 \pm 0.01a
Σ SAT ¹	3.84 \pm 0.25a	2.06 \pm 0.42b	1.78 \pm 0.14b
Σ MUFA ²	1.08 \pm 0.06	1.35 \pm 0.32	1.20 \pm 0.08
Σ PUFA ³	1.97 \pm 0.09c	2.71 \pm 0.45b	3.61 \pm 0.05a
Σ HUFA ⁴	0.10 \pm 0.01c	1.00 \pm 0.20b	1.80 \pm 0.03a

¹Suma de los ácidos grasos saturados; ²Suma de los ácidos grasos mono-insaturados;

³Suma de los ácidos grasos poli-insaturados; ⁴Suma de los ácidos grasos altamente insaturados (\geq cuatro doble enlaces). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Nota: Las sumatorias incluyen el total de ácidos grasos de cada clase (aún los no mostrados en la Tabla).

II. 5. 1. Desempeño biológico

Las dietas experimentales fueron bien aceptadas por los camarones y el consumo de alimento no fue significativamente diferente entre los tres tratamientos (Figura 16A). Al hacer la comparación entre el peso inicial y final (prueba *t* de Student) de los camarones alimentados con cada una de las dietas, se observó una diferencia significativa en aquellos alimentados con la dieta media y alta en HUFA (Figura 16B). Dicho resultado indica un aumento de peso para estos camarones durante el periodo experimental. Por otro lado, el número de mudas fue significativamente mayor en los tanques donde los camarones fueron alimentados con la dieta media en HUFA con respecto a la dieta alta en HUFA (Figura 16C). La supervivencia fue del 100% para los camarones de los tres tratamientos (resultado no mostrado).

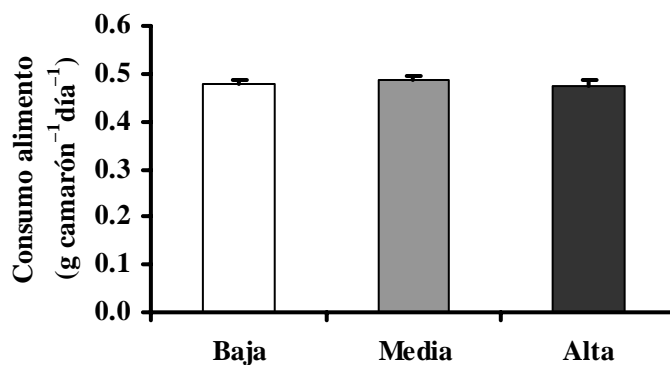
II. 5. 2. Variables inmunes

No se encontraron diferencias significativas en el CTH, la producción de anión superóxido, o la actividad de la SOD tanto en el hepatopáncreas como en el músculo (Figura 17). Aunque la cuenta de hemocitos fue mayor en los camarones de las dietas media y alta en HUFA, la diferencia no resultó ser significativa ($P = 0.14$). En contraste, la concentración en HDL-BGBP fue significativamente mayor en el plasma de los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA, comparado con los alimentados con la dieta baja en HUFA (Figura 18).

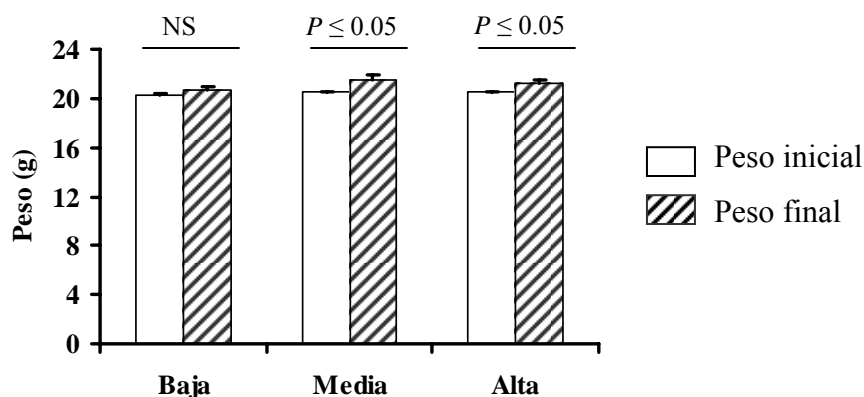
II. 5. 3. Composición de ácidos grasos en músculo

No se observaron diferencias significativas en la proporción de AA en los lípidos neutros del músculo de los camarones alimentados con las tres diferentes dietas (Figura 19A). Por el contrario, una mayor proporción de EPA fue encontrada en estos lípidos al alimentar los camarones con las dietas media y alta en HUFA (Figura 19B). También, las proporciones de DHA y HUFA fueron significativamente mayores en los lípidos neutros del músculo de los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA (Figuras 19C y 19D). Los lípidos polares del músculo de los camarones mostraron una proporción de AA significativamente mayor cuando estos fueron alimentados con las dietas media y alta en HUFA (Figura 20A). Además, se observó un incremento significativo en la proporción de EPA, DHA, y HUFA con el aumento del contenido de HUFA sucesivo en las dietas baja, media y alta (Figuras 20B, 20C, 20D).

A) Consumo de alimento



B) Peso inicial y final



C) Ocurrencia de mudas

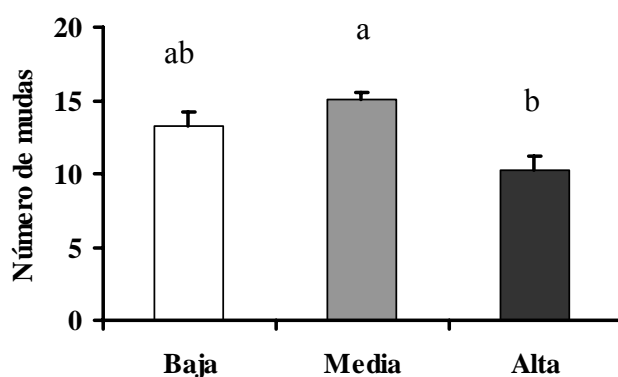
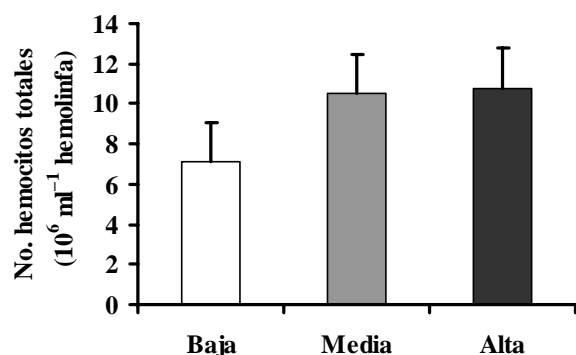
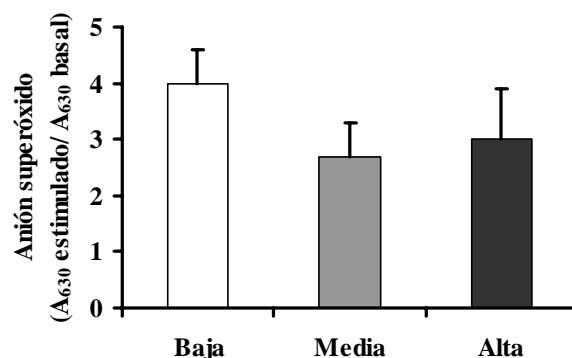


Figura 16. Desempeño biológico de los camarones alimentados con una dieta baja (barra blanca), media (barra gris) y alta (barra negra) en HUFA, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas. Para el consumo de alimento y la ocurrencia de muda, el número de réplicas para cada tratamiento fue de $n = 3$. Para el peso inicial y final, el número de camarones fue de $n = 45$ y $n = 24$ respectivamente. Los resultados están presentados como promedio \pm error estándar. NS = No significativo.

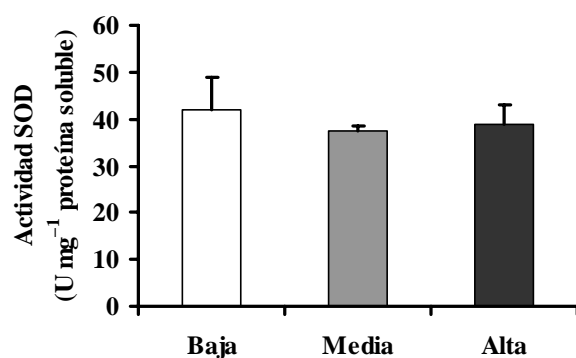
A) Conteo total de hemocitos



B) Producción de anión superóxido



C) Actividad SOD en hepatopáncreas



D) Actividad SOD en músculo

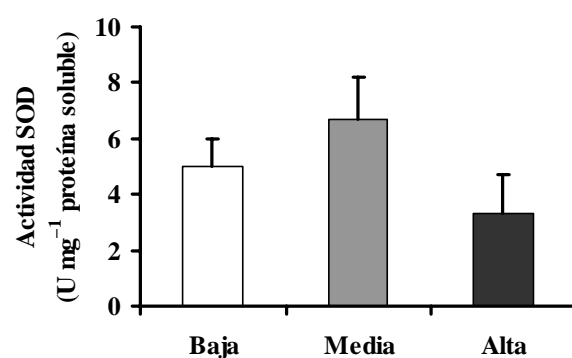


Figura 17. Variables inmunes determinadas en camarones alimentados con una dieta baja (barra blanca), media (barra gris) y alta (barra negra) en HUFA, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los resultados están presentados como promedio \pm error estándar. El número de camarones utilizado para cada tratamiento está detallado en la Tabla XI.

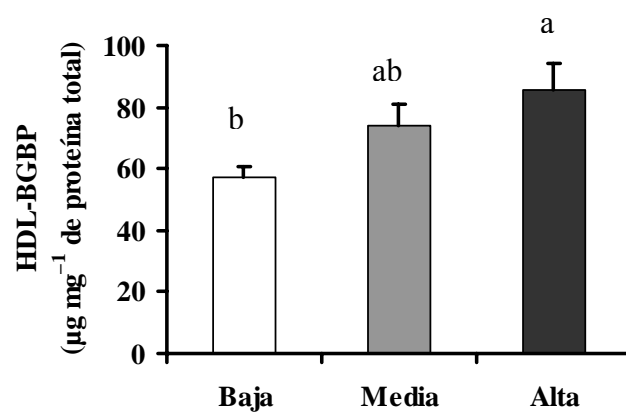


Figura 18. Concentración en HDL-BGBP determinada en el plasma de camarones alimentados con una dieta baja (barra blanca), media (barra gris) y alta (barra negra) en HUFA, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los resultados están presentados como promedio \pm error estándar. El número de camarones utilizado para cada tratamiento está detallado en la Tabla XI.

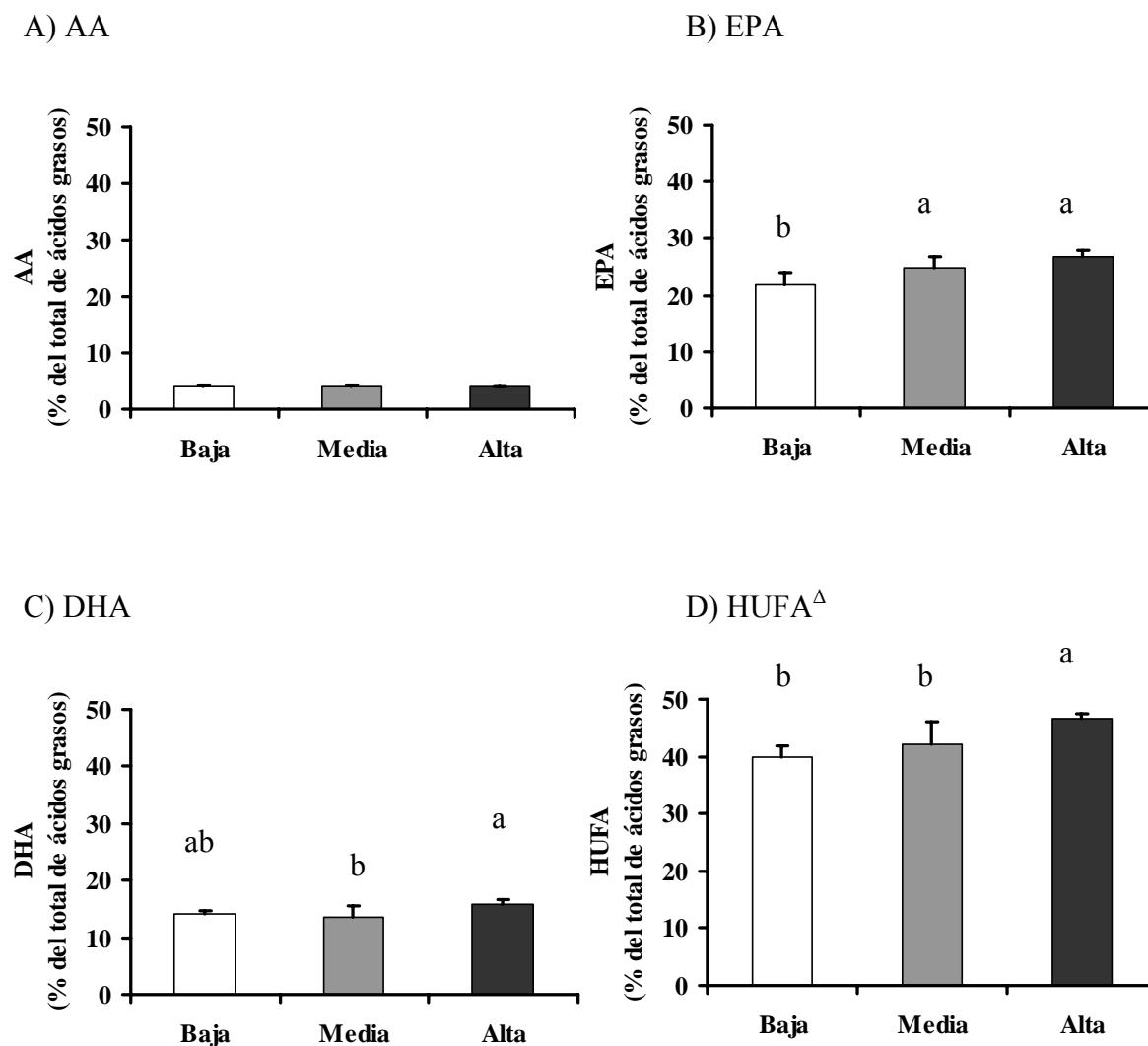


Figura 19. Ácidos grasos altamente insaturados determinados en la fracción neutra del músculo de camarones alimentados con una dieta baja (barra blanca), media (barra gris) y alta (barra negra) en HUFA, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los resultados (promedio \pm error estándar) están presentados como porcentajes de ácidos grasos totales. ^ΔIncluye el total de ácidos grasos altamente insaturados (\geq cuatro doble enlaces). El número de camarones utilizado para cada tratamiento está detallado en la Tabla XI.

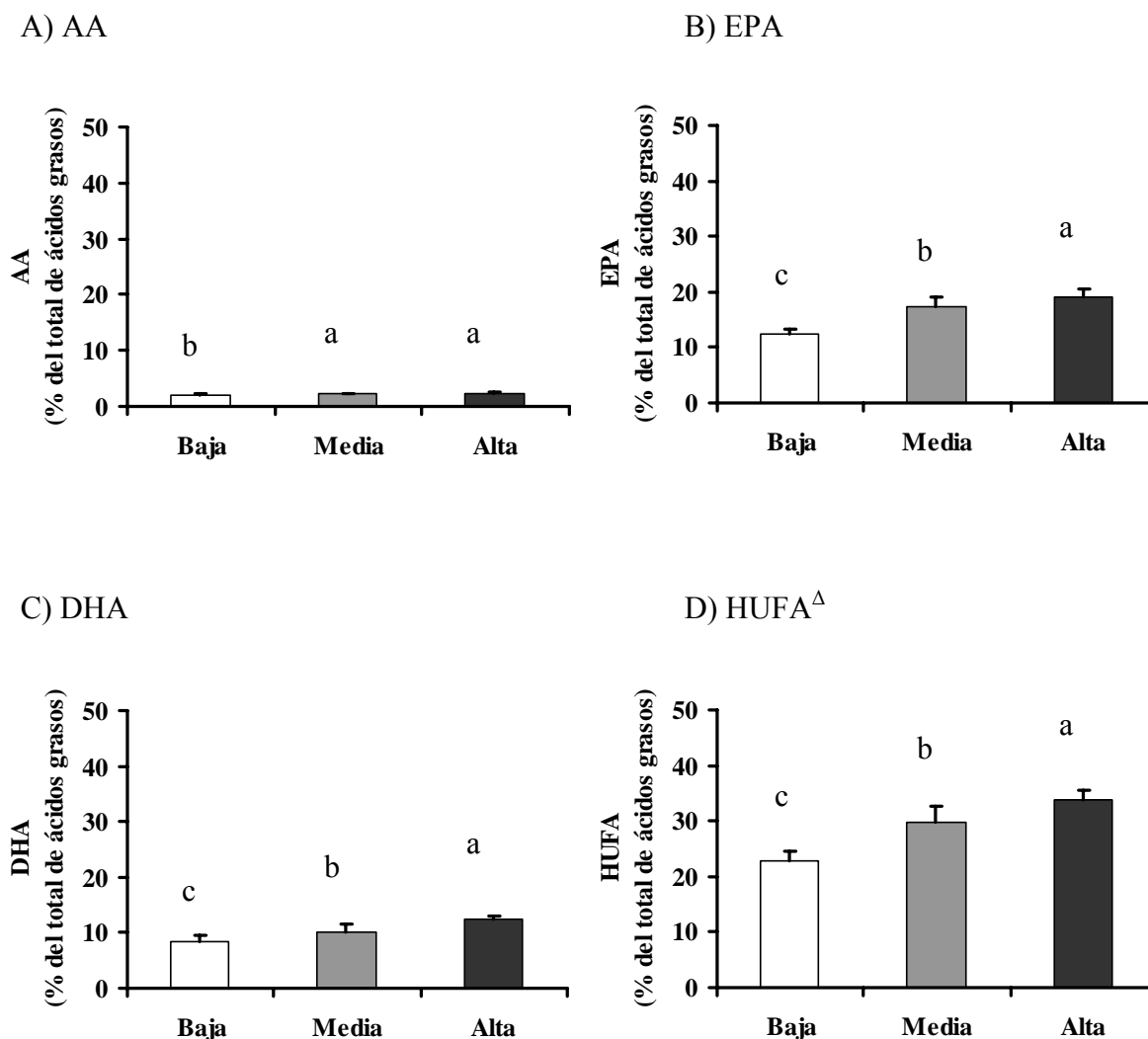


Figura 20. Ácidos grasos altamente insaturados determinados en la fracción polar del músculo de camarones alimentados con una dieta baja (barra blanca), media (barra gris) y alta (barra negra) en HUFA, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas. Los resultados (promedio \pm error estándar) están presentados como porcentajes de ácidos grasos totales. ^ΔIncluye el total de ácidos grasos altamente insaturados (\geq cuatro doble enlaces). El número de camarones utilizado para cada tratamiento está detallado en la Tabla XI.

II. 6. Discusión

Los niveles de HUFA empleados en las dietas experimentales estuvieron dentro del intervalo usado en otros estudios de nutrición con camarones peneidos (ver Tabla III). Considerando que una dieta comercial para camarón contiene entre 0.7 y 0.9% de HUFA (Chim *et al.*, 2001), la dieta baja del presente experimento resultó relativamente deficiente en HUFA. En cambio, la dieta alta mostró un exceso en HUFA y la dieta media se acercó al nivel promedio presente en las dietas comerciales.

Los diferentes niveles de HUFA en la dieta tuvieron efecto sobre el desempeño biológico con excepción del consumo de alimento. Las dietas media y alta en HUFA favorecieron la ganancia en peso de los camarones. En el caso de los camarones alimentados con la dieta media en HUFA, este resultado se vio también reflejado con el aumento en la ocurrencia de mudas, el cual podría ser atribuido en parte al incremento de AA en la dieta. En este sentido, hay evidencia que los eicosanoides derivados de este ácido graso probablemente están involucrados en el proceso de muda de los crustáceos. Koskela *et al.* (1992) reportaron que el camarón *Penaeus esculentus* inyectado con la prostaglandina E₂ mostró un ciclo de muda más corto (14.8 ± 0.6 días) que en camarones que no recibieron esta inyección (17.2 ± 0.5 días). Sin embargo, eso no explica por qué los animales alimentados con la dieta alta en HUFA no mostraron el mismo patrón. Es posible que un exceso en la concentración de AA u otro HUFA en la dieta alta en HUFA inhiba el proceso de muda. El DHA y el EPA también pudieron haber sido dos ácidos grasos importantes en la ocurrencia de mudas. En el caso particular del DHA, Xu *et al.* (1993, 1994b) observaron una mayor frecuencia de muda en juveniles de camarón *F. chinensis*

alimentados con una dieta conteniendo 1% de este ácido graso. El incremento en la ocurrencia de mudas podría también resultar hasta cierto punto por una condición de estrés tal como se discutirá en el capítulo III. Sin embargo, en este experimento se descarta un posible efecto de estrés ya que cada tanque recibió las mismas condiciones ambientales (temperatura, flujo de agua, etc.) y el mismo cuidado. Se atribuye, en cambio, la mayor ganancia de peso de los camarones alimentados con la dieta media en HUFA a la mayor frecuencia de mudas encontrada para este tratamiento.

Los tres niveles de HUFA en la dieta no afectaron el CTH, la capacidad de los hemocitos a producir anión superóxido, ni la actividad de la SOD. De igual manera, Chim *et al.* (2001) no observaron diferencias significativas en el CTH del camarón *L. stylirostris* después de haberlo alimentado 21 días con una dieta baja (0.2%) y alta (1.4%) en HUFA n-3 respectivamente. Por el contrario, estos autores encontraron que la capacidad de producción de anión superóxido de los hemocitos se incrementó en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA n-3. La ausencia de significancia en el resultado de anión superóxido del presente trabajo puede deberse a la gran variación observada dentro de los tratamientos. Respecto a la SOD, la actividad en músculo fue inferior a la que se observó en hepatopáncreas lo que indica que este último tejido tiene mayor actividad antioxidante.

El suplemento de HUFA en la dieta incrementó la concentración de la HDL-BGBP. A su vez, un incremento de HDL-BGBP podría elevar la eficiencia de los mecanismos de defensa inmune de los camarones al momento de ser invadidos por un patógeno. El aumento de esta lipoproteína con respecto al nivel de HUFA en la dieta confirma una de las

hipótesis planteadas. Como la síntesis de la HDL-BGBP se realiza en el hepatopáncreas (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000), es probable que un aumento en HUFA en dicho tejido provocado por el alto nivel de HUFA en la dieta, influyó la síntesis de esta lipoproteína. Finalmente, la síntesis de la HDL-BGBP pudo haber sido estimulada para el transporte de lípidos, ya que esta es otra función de dicha lipoproteína. Un incremento en el transporte de lípidos es probable dado que los camarones estaban en etapa sub-adulta, es decir el inicio de su proceso reproductivo. A raíz de estos resultados, se contempla como perspectiva el análisis de la influencia de los HUFA en la dieta sobre la síntesis de HDL-BGBP, así como sobre la composición de ácidos grasos de esta lipoproteína.

El incremento de los HUFA de la dieta se reflejó también en la composición de los lípidos neutros y polares del músculo. La incorporación de los HUFA de la dieta al tejido muscular del camarón blanco ya había sido reportado por González-Félix *et al.* (2002a; b; 2003). También, se obtuvo en otros tejidos como el hepatopáncreas (González-Félix *et al.*, 2002a; b) y las branquias (Palacios *et al.*, 2004; Hurtado *et al.*, 2006). Estos resultados indican que los HUFA pueden incorporarse en diversas estructuras celulares del camarón, entre otros, podrían ser los hemocitos.

CAPÍTULO III

**Respuesta metabólica e inmune de *L. vannamei* alimentado con dietas
que contienen diferentes concentraciones en HUFA
y sometido a una condición de estrés crónico
(ver artículo sometido Mercier *et al.*, 2007; Anexo XII).**

El objetivo de este capítulo fue evaluar si el suplemento de HUFA en la dieta influye la respuesta metabólica e inmune del camarón blanco cuando está sometido a una situación de estrés crónico.

III. 1. Metodología

III. 1. 1. Dietas experimentales

Para este objetivo, se diseñaron dos dietas isocalóricas conteniendo 35% de proteínas y 8.5% de lípidos. Estas dos dietas se diferenciaban solamente por su contenido de HUFA (bajo y alto) preparadas utilizando emulsiones lipídicas con 0 y 50% de HUFA, respectivamente (ICES Standard Reference Emulsion, Universidad de Ghent, Bélgica; ICES, 1997). Los procedimientos de la formulación y fabricación de las dietas están detallados en el Anexo XIII (A y B). Por comodidad, se hablará de dieta baja y alta en HUFA, haciendo referencia respectivamente a la emulsión de 0 ó 50% de HUFA empleada. Ambas dietas fueron elaboradas como pelets y las dietas fueron analizadas para conocer sus composiciones químicas proximales (Anexo XIII C), estabilidad en agua (Anexo XIII D) y perfiles de ácidos grasos (Anexo IX).

Los resultados de la composición proximal de las dietas experimentales se muestran en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Composición proximal y estabilidad en agua de las dietas baja y alta en HUFA. Los resultados están presentados como promedio \pm desviación estándar, a la excepción del extracto libre de nitrógeno que está mostrado como promedio únicamente.

Análisis	Dieta baja en HUFA	Dieta alta en HUFA
Humedad ¹	7.82 \pm 0.37	7.85 \pm 0.38
Proteína ²	33.36 \pm 1.00	33.44 \pm 1.01
Extracto etéreo ²	6.87 \pm 0.60	6.62 \pm 0.58
Fibra cruda ²	2.98 \pm 0.27	2.91 \pm 0.26
Extracto libre de nitrógeno ²	35.81	36.43
Estabilidad en agua ¹	88.1 \pm 0.17	87.4 \pm 0.20

¹(%); ²(g 100g⁻¹ materia seca)

III. 1. 2. Diseño experimental

Se capturaron camarones de un estanque supralitoral del CIBNOR y se transfirieron al sistema de tanques de concreto descrito en el capítulo I. Ejemplares de aproximadamente 11 g (peso inicial) fueron seleccionados y colocados a una densidad de 30 organismos por tanque (alrededor de 20 organismos por m²). En total, 18 tanques fueron utilizados, de los cuales 12 fueron asignados para un experimento de estrés crónico y 6 para un experimento de estrés agudo. El experimento de estrés agudo no era parte del objetivo planteado en este capítulo. Sin embargo, se implementó para verificar si el estímulo de manipulación aplicado tenía un carácter estresante, duda que surgió después de analizar los resultados del experimento del capítulo I. Además, se quiso comparar la respuesta de los camarones bajo condiciones de estrés crónico con la respuesta provocada ante un estrés agudo. Los dos experimentos fueron realizados al mismo tiempo.

Los camarones fueron mantenidos en condiciones de flujo constante de agua, a una temperatura de 26.6 \pm 1.3°C y con fotoperíodo natural (aproximadamente 11 horas luz y 13

horas oscuridad). Los animales fueron aclimatados primero a las unidades experimentales por cinco días, durante los cuales fueron alimentados con la misma dieta comercial (35% proteínas; PIASA, La Paz, México) que recibían en el estanque supralitoral. A partir del sexto día, se les dieron las dietas experimentales dos veces al día (10:00 am – 6:00 pm) a saciedad aparente (aproximadamente 4.5% de la biomasa). Cada mañana, se sifonearon los tanques y se registraron las mudas, los organismos muertos y el alimento no consumido en cada tanque. A diferencia del experimento del capítulo I, se pudo determinar el consumo de alimento y el número de mudas gracias a ciertas adaptaciones que se hicieron en la técnica de sifoneo y el diámetro del propio sifón. Así, para estas dos evaluaciones, se colectó en una malla todo el producto del sifoneo y al final se separó el alimento no consumido por un lado y los restos de los exosqueletos por otro. El número de mudas se cuantificó contando los restos de cefalotórax, ya que se había observado anteriormente que ésta era la parte que se tardaban más los camarones en ingerir. El alimento no consumido se evaluó mediante una escala previamente calibrada que relaciona el tamaño de la “huella” de alimento hidratado con agua de mar (18 h), disperso en una sola capa, con el peso seco correspondiente (Figura 21). Los organismos que se encontraron muertos fueron reemplazados por vivos a partir de un lote adicional de camarones marcados. Estos animales no fueron considerados para el muestreo de los experimentos pero ayudaron a mantener la densidad de 30 organismos en cada tanque durante los experimentos.

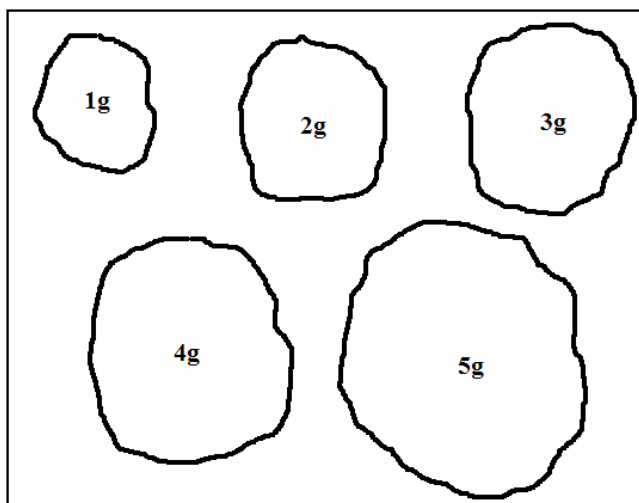


Figura 21. Ejemplo de las huellas que se utilizaron para evaluar el alimento no consumido. La ilustración no mantiene la proporción entre las huellas, ni está a la escala real.

Experimento estrés crónico:

Para cada una de las dietas se asignaron seis tanques, que fueron divididos en dos grupos; el primero, donde los organismos fueron sometidos a una condición de estrés crónico (tres tanques) y el segundo, donde los camarones fueron considerados como grupo control (tres tanques). Un estímulo estresor se aplicó diariamente (9:30 am) al primer grupo durante 30 días, a partir del octavo día de alimentación con las dietas experimentales. Este estímulo se aplicó de una manera ligeramente diferente a la del capítulo I (Figura 22) y consistió en capturar a todos los organismos de un mismo tanque con una red de mano (1), transferirlos en una bolsa de tela dentro de una cubeta con agua (aproximadamente 6 l) (2); confinarlos en la cubeta durante cinco minutos (3), regresarlos a la red de mano, exponerlos al aire durante 5 segundos (4) y liberarlos nuevamente en su tanque (5). Cada semana, se intensificó el estímulo dejando los camarones cinco segundos más al aire (4) antes de regresarlos a su tanque, con el fin de evitar que se adaptaran al estímulo estresor como se

sospechó que ocurrió en el capítulo I. El estímulo estresor estuvo compuesto de varios procesos como son la persecución, el confinamiento y la exposición al aire, que son acciones que se presentan en granjas de cultivo durante las biometrías y selección de animales, entre otros. Se tuvo un cuidado especial para no perturbar a los animales del grupo control.

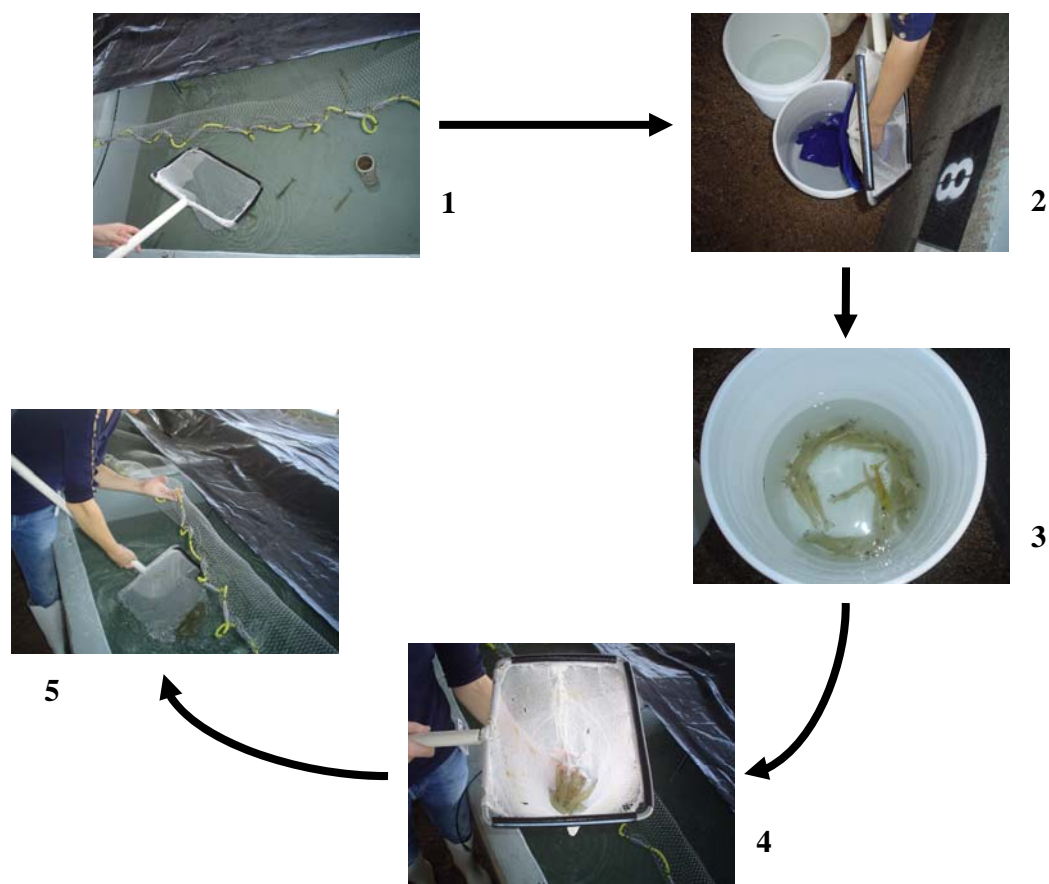


Figura 22. Secuencia del estímulo estresor aplicado en los tanques de concreto. 1- captura de los camarones con una red; 2- transferencia de los animales en una bolsa de tela dentro de una cubeta con agua; 3- confinamiento de los camarones en la cubeta durante 5 minutos; 4- regreso de los camarones a la red de mano y exposición de estos al aire durante 5 segundos; 5- retorno de los camarones a sus tanques.

Experimento estrés agudo:

Para cada dieta, se asignaron tres tanques. Las condiciones de mantenimiento de los organismos durante el experimento fueron las mismas que las de los tanques de control del experimento de estrés crónico. Cada mañana, se sifonearon los tanques y se reemplazaron los organismos muertos. No se registraron la ocurrencia de mudas, ni el consumo de alimento. Previo al muestreo, se aplicó (en una sola ocasión) un estímulo estresor de manipulación similar al del estrés crónico para medir la respuesta metabólica e inmune 1 y 24 horas después de la aplicación del estímulo. Un grupo control fue muestreado antes de aplicar el estímulo estresor de manipulación.

III. 2. Muestreo de los camarones**III. 2.1. Variables metabólicas***Estrés crónico y agudo:*

El muestreo se hizo en dos submuestras: el primero se realizó como se describió en el capítulo I; se obtuvieron muestras de hemolinfa, y se congeló el cefalotórax y el primer segmento abdominal a -70°C . En el segundo submuestreo, se extrajo hemolinfa a partir de la cavidad pericárdica pinchando la membrana intersegmental (entre el cefalotórax y el abdomen) con una aguja para medir osmolaridad. La muestra (10 μl) se colectó con una pipeta cuya punta fue previamente enfriada en agua desionizada a 4°C . El número de animales muestreados en cada submuestreo se detalla en la Tabla XIV. En todos los casos, cada organismo fue pesado (peso final) y sexado, y se le determinó el estadio de muda

observando al microscopio las setas de los urópodos (Robertson *et al.*, 1987). Los camarones fueron sometidos a un ayuno de 24 horas previo al muestreo.

Tabla XIV. Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables metabólicas en el capítulo III.

	Dieta baja en HUFA		Dieta alta en HUFA	
	Control	Estrés	Control	Estrés
<i>Estrés crónico</i>				
1 ^{ero} submuestreo	15	15	15	15
2 ^{ndo} submuestreo	9	9	9	9
<i>Estrés agudo</i>				
1 ^{ero} submuestreo	6	6 a 1 h, 6 a 24 h	6	6 a 1 h, 6 a 24 h
2 ^{ndo} submuestreo	6	6 a 1 h, 6 a 24 h	6	6 a 1 h, 6 a 24 h

III. 2. 2. Variables inmunes

Estrés crónico y agudo:

El muestreo consistió de tres submuestras, y para cada uno se utilizaron organismos distintos: en el primero, se extrajo hemolinfa para medir el tiempo de coagulación. La extracción se hizo de la misma manera y utilizando los mismos organismos que para la osmolaridad. En el segundo, se colectó nuevamente hemolinfa y se guardó el cefalotórax, así como el primer segmento abdominal de los camarones para medir las mismas variables inmunes que las que se describieron en el capítulo I. El tercer submuestreo fue solamente realizado para el experimento de estrés crónico y tenía como propósito determinar la concentración en HDL-BGBP en el plasma así como la composición de ácidos grasos en los hemocitos de los camarones. Consistió en extraer aproximadamente 0.5 ml de hemolinfa con jeringas previamente llenadas con 1 ml de

anticoagulante conteniendo EDTA y enfriado a 4°C (Vargas-Albores *et al.*, 1993; Campa-Córdova *et al.*, 2002). La hemolinfa fue tomada de los sacos hemolinfáticos ventrales de los camarones y se colocó en tubos de vidrio que fueron centrifugados 5 minutos \times 800 g a 5°C para la precipitación de los hemocitos en pelet. El sobrenadante (plasma) fue transferido a tubos “Eppendorf” y congelado a -70°C para posteriores análisis de la lipoproteína HDL-BGBP. El pelet que contenía los hemocitos fue transferido junto con la punta de una pipeta Pasteur estéril a un vial de vidrio de 4 ml, al cual se agregaron 2 ml de una solución de cloroformo: metanol (2:1) (Bligh y Dyer, 1959), 10 μl del estándar interno del ácido graso 23:0, y 10 μl del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT). En cada vial, se hizo un “pool” de 3 pelets de hemocitos por lo que para cada tratamiento, se hicieron 3 “pools”.

El número de animales muestreados en cada submuestreo se detalla en la Tabla XV. En los tres submuestréos, se determinó el peso (peso final), el sexo y el estadio de muda de cada organismo observando al microscopio las setas de los urópodos (Robertson *et al.*, 1987). Los camarones fueron sometidos a un ayuno de 24 horas previo a los muestreos. Éstos se realizaron temprano en las mañanas, a una hora que correspondía al momento donde se aplicaba el estímulo estresor.

Tabla XV. Número de ejemplares muestreados para la determinación de las variables inmunes en el capítulo III.

	Dieta baja en HUFA		Dieta alta en HUFA	
	Control	Estrés	Control	Estrés
<i>Estrés crónico</i>				
1 ^{ero} submuestreo	9	9	9	9
2 ^{ndo} submuestreo	9	9	9	9
3 ^{ero} submuestreo	9	9	9	9
<i>Estrés agudo</i>				
1 ^{ero} submuestreo	6	6 a 1 h, 6 a 24 h	6	6 a 1 h, 6 a 24 h
2 ^{ndo} submuestreo	6	6 a 1 h, 6 a 24 h	6	6 a 1 h, 6 a 24 h

III. 3. Análisis de laboratorio

III. 3. 1. Análisis bioquímicos

Estrés crónico y agudo

A partir de las muestras obtenidas para la determinación de las variables metabólicas, se cuantificaron el mismo día del muestreo las concentraciones de hemocianina y proteínas totales en hemolinfa (Anexo V, A y B, respectivamente). En fechas posteriores, se determinaron también en hemolinfa las concentraciones de triacilglicéridos, colesterol, lípidos totales, lactato y glucosa, como se detalló en el Anexo V (de C a G). A partir de los homogeneizados de hepatopáncreas, se midieron las concentraciones en proteínas totales, triacilglicéridos, lípidos totales y carbohidratos. Los protocolos de estos análisis se muestran en el Anexo VI. En los homogeneizados de músculo, se determinaron las concentraciones de proteínas totales, carbohidratos y lactato. En el Anexo VI, se detallan las metodologías utilizadas para estos análisis.

Para la determinación de la osmolaridad, 10 μ l de hemolinfa fueron colocados en un filtro de papel y se procedió a determinar la osmolaridad usando un osmómetro de vapor (Modelo 5520, Wescor, Logan, UT, USA). Esta determinación se realizó durante el muestreo, enseguida de la extracción de hemolinfa.

III. 3. 2. Análisis de componentes inmunes

Estrés crónico y agudo:

Para medir el tiempo de coagulación, se colectó un volumen definido de hemolinfa en un tubo capilar (diámetro interior: 1.1–1.2 mm; longitud: 75 mm; Corning, Garner, NC, USA), el cual se invirtió verticalmente varias veces hasta observar la coagulación de la hemolinfa. El tiempo se registró con un cronómetro a partir del momento que se pinchó el camarón y hasta que la hemolinfa dejó de fluir en el tubo capilar. Cuando el tiempo excedió de 60 segundos, no se consideró el dato.

Las determinaciones de CTH y producción de anión superóxido en la hemolinfa fueron realizadas como se mencionó en el capítulo I, y la metodología está descrita en el Anexo VII (A y B). Para la determinación de la producción de anión superóxido, la absorbancia fue leída a 630 nm y no a 650 nm como se realizó en el capítulo I, ya que en este momento se consiguió el filtro de 630 nm indicado en el método de Song y Hsieh (1994).

La determinación de la HDL-BGBP en hemolinfa fue realizada por ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) como se mencionó en el capítulo II. El protocolo utilizado para esta determinación se muestra en el Anexo X (A). Se midió también la

concentración de proteínas totales en el plasma de camarón con el fin de expresar los resultados de concentración de HDL-BGBP por miligramo de proteína total. La metodología de este análisis se detalla en el Anexo X (B).

Se determinaron los ácidos grasos en los hemocitos de camarón después de haber separado los lípidos neutros de los polares, como se muestra en el Anexo XIV.

III. 4. Análisis estadísticos

Se verificaron la normalidad y la homogeneidad de varianzas (Sokal y Rohlf, 1995) de todas las variables morfométricas, metabólicas e inmunes. Cuando alguna de las variables no cumplía uno de estos supuestos, los datos fueron transformados y probados nuevamente. El análisis de los resultados se realizó usando ANOVA bifactorial para todas las variables, utilizando como primer factor independiente las dietas baja y alta en HUFA y como segundo factor independiente la condición de estrés (Experimento estrés crónico: control y estrés; Experimento estrés agudo: control, 1 h, 24 h). Las diferencias entre las medias de cada grupo (medias individuales) fueron determinadas por una prueba *a posteriori* de Tukey, solamente cuando la interacción entre ambas variables independientes fue significativa. De lo contrario, las diferencias significativas entre las medias globales (medias agrupadas, ya sea de la condición de dieta o de estrés) están indicadas en la sección de resultados en el texto. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA™ (versión 5.5; StatSoft, Tulsa, OK, USA) y las diferencias fueron reportadas como significativas si $P \leq 0.05$. Todos los datos analizados a partir de estas variables se presentan como promedio \pm error estándar.

III. 5. Resultados

Las dietas experimentales mostraron una composición proximal muy similar (Tabla XIII) pero una diferencia en sus niveles de ácidos grasos (Tabla XVI). La dieta alta en HUFA se caracterizó por un contenido de 2.1% de HUFA mientras que la dieta baja en HUFA contenía 0.07%. Por lo anterior, se corroboró que el contenido de HUFA fue el factor de calidad nutritiva más determinante entre las dos dietas experimentales.

Tabla XVI. Principales ácidos grasos ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ dieta) de las dietas baja y alta en HUFA. Los resultados están dados en peso húmedo.

	Dieta baja en HUFA ($n = 2$)	Dieta alta en HUFA ($n = 2$)
<i>Ácidos grasos</i>		
14:0	1.71	0.31
16:0	2.55	2.06
18:0	0.54	0.52
16:1n-7	0.23	0.27
18:1n-9	1.63	1.48
18:1n-7	0.18	0.22
18:2n-6	3.13	2.81
18:3n-3	0.34	0.34
20:4n-6	0.01	0.09
20:5n-3	0.03	1.21
22:6n-3	0.03	0.79
$\Sigma \text{ SAT}^1$	8.85	3.17
$\Sigma \text{ MUFA}^2$	2.15	2.22
$\Sigma \text{ PUFA}^3$	3.64	5.31
$\Sigma \text{ HUFA}^4$	0.07	2.10

¹Suma de los ácidos grasos saturados; ²Suma de los ácidos grasos mono-insaturados;

³Suma de los ácidos grasos poli-insaturados; ⁴Suma de los ácidos grasos altamente insaturados (\geq cuatro doble enlaces).

Nota: Las sumatorias incluyen el total de ácidos grasos de cada clase (aún los no mostrados en la Tabla).

III. 5. 1. Estrés crónico

No se observaron diferencias significativas en el peso al inicio del experimento (Figura 23A). En contraste, los camarones expuestos al estrés de manipulación por 30 días y alimentados con ambas dietas experimentales (promedio global: 11.6 ± 0.1 g) mostraron un peso significativamente menor que los camarones control (promedio global 12.8 ± 0.2 g; Figura 23B). La supervivencia al final del experimento fue en general alta, sin embargo, los camarones estresados y alimentados con la dieta baja en HUFA tuvieron una supervivencia significativamente menor en comparación con los camarones de control alimentados con la misma dieta (Figura 23C). El número de mudas totales fue significativamente mayor para los camarones expuestos al estrés crónico (promedios globales de los camarones alimentados con las dos dietas experimentales: 35 ± 2.8 para animales de control *vs.* 49 ± 3.0 para animales estresados) y no se observaron diferencias respecto a la dieta (Figura 24A). Las dietas experimentales fueron bien aceptadas por los camarones, sin embargo, el consumo de la dieta alta en HUFA fue menor comparado con la dieta baja en HUFA (promedios globales: 11.1 ± 0.1 g para la dieta baja en HUFA *vs.* 10.6 ± 0.1 g para la dieta alta en HUFA; Figura 24B). También se observó que el estímulo estresor crónico afectó significativamente el consumo de alimento (promedios globales: 11.3 ± 0.1 g para los camarones de control *vs.* 10.5 ± 0.1 g para los camarones estresados).

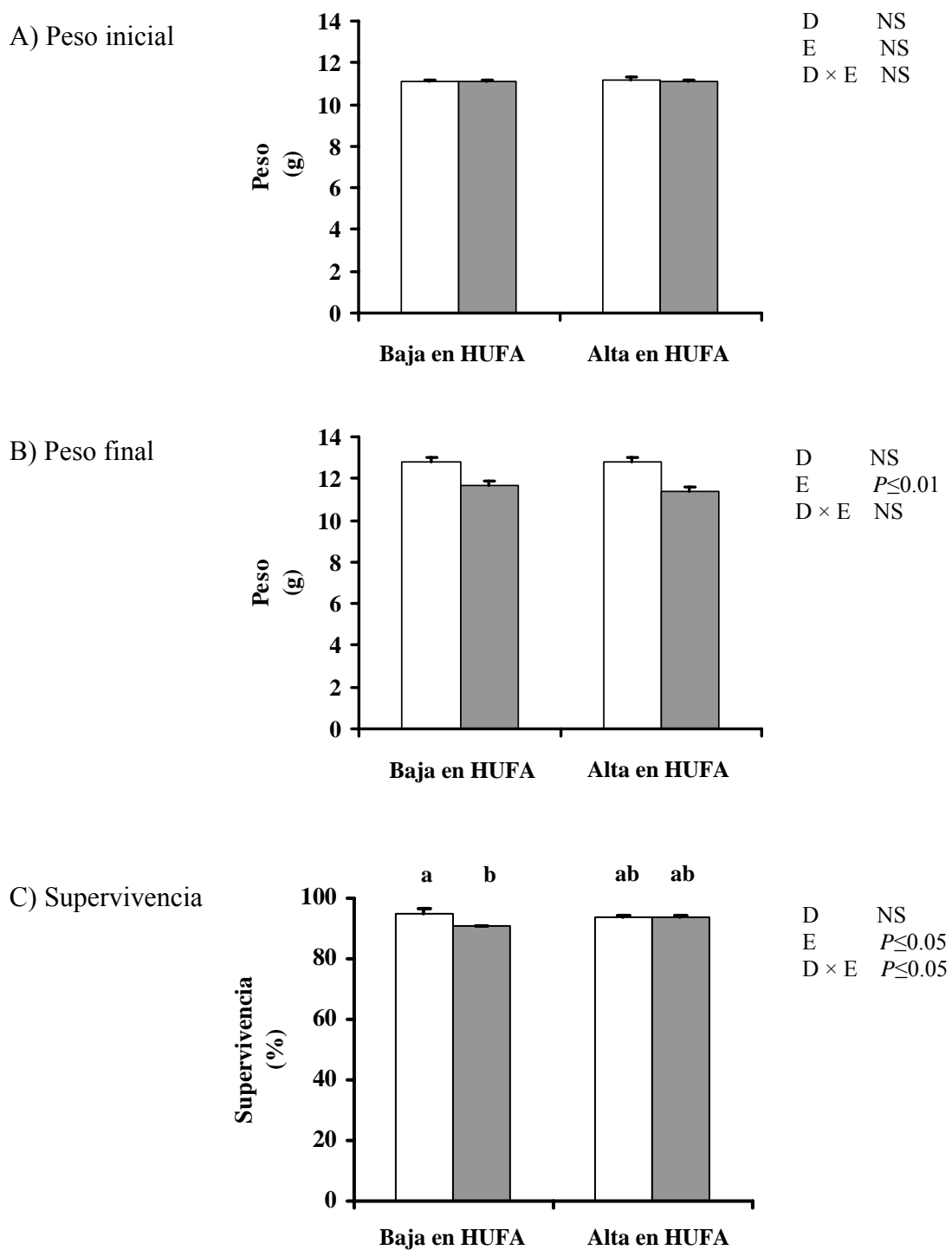
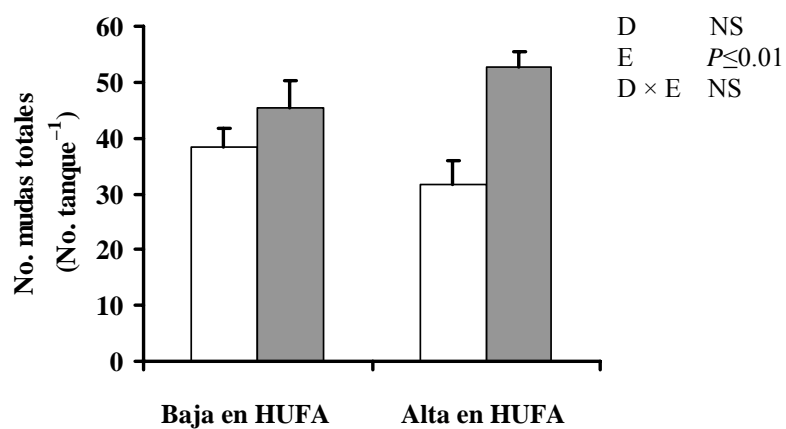


Figura 23. Pesos y supervivencia determinados en los camarones de los grupos control (barras blancas) y estrés crónico (barras grises) alimentados con las dietas baja y alta en HUFA. Para el peso inicial y final, el número de camarones fue de $n = 90$ y $n = 42$, respectivamente. Para la supervivencia, el número de réplicas fue de $n = 3$ para cada grupo. D = Dieta; E = Estrés; NS = No significativo.

A) Ocurrencia de mudas



B) Consumo de alimento

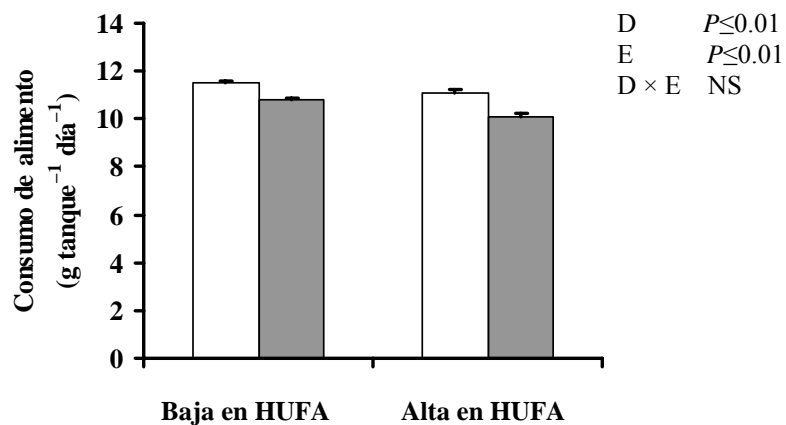


Figura 24. Ocurrencia de mudas y consumo de alimento determinados en los camarones de los grupos control (barras blancas) y estrés crónico (barras grises) alimentados con las dietas baja y alta en HUFA. Para la ocurrencia de mudas y el consumo de alimento, el número de réplicas para cada grupo fue de $n = 3$. D = Dieta; E = Estrés; NS = No significativo.

Los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA mostraron una proporción de HUFA significativamente mayor en los lípidos neutros de los hemocitos comparados con los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA (promedio globales: $15.4 \pm 2.2\%$ de HUFA de los ácidos grasos totales para la dieta baja en HUFA *vs.* $23.4 \pm 1.5\%$ de HUFA de los ácidos grasos totales para la dieta alta en HUFA, Tabla XVII). Este efecto fue aún más evidente en los lípidos polares de los hemocitos (promedios globales: $18.9 \pm 3.1\%$ de HUFA de los ácidos grasos totales para la dieta baja en HUFA *vs.* $33.1 \pm 1.1\%$ de HUFA de los ácidos grasos totales para la dieta alta en HUFA, Tabla XVII). En esta misma fracción, las proporciones de AA y EPA en los camarones del grupo control alimentados con la dieta alta en HUFA fueron aproximadamente tres veces mayores que en los camarones del grupo control alimentados con la dieta baja en HUFA (Tabla XVII). De igual manera, la proporción de DHA fue hasta cuatro veces más alta en los camarones de control alimentados con la dieta alta en HUFA. Además del efecto de la dieta, las proporciones de EPA y DHA en la fracción polar estuvieron afectadas por las condiciones de estrés crónico, ya que la interacción (dieta \times estrés) resultó ser significativa. Los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA y expuestos diariamente al estímulo estresor, mostraron una proporción significativamente mayor de estos ácidos grasos en los lípidos polares de sus hemocitos, comparados con los camarones de control alimentados con la misma dieta. Aunque no fue significativa, la misma tendencia se observó con los lípidos neutros.

Tabla XVII. Principales ácidos grasos en la fracción neutra y polar de los hemocitos de los camarones alimentados con las dietas baja o alta en HUFA, y expuestos a una condición de estrés crónico. Los resultados (promedio \pm error estándar) están presentados como porcentajes de ácidos grasos totales. Las tres últimas columnas muestran los resultados de las ANOVAs: D = Dieta; E = Estrés; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	Dieta baja en HUFA		Dieta alta en HUFA		D	E	D \times E
	Control	Estrés	Control	Estrés			
Fracción neutra							
14:0	4.1 \pm 0.1a	3.5 \pm 0.2ab	2.4 \pm 0.1b	3.3 \pm 0.5ab	**	NS	*
16:0	23.9 \pm 1.4	21.5 \pm 0.7	20.1 \pm 0.4	19.2 \pm 1.3	*	NS	NS
18:0	15.3 \pm 0.5	13.6 \pm 0.7	14.6 \pm 0.3	14.9 \pm 0.6	NS	NS	NS
16:1n-7	1.2 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	1.2 \pm 0.3	NS	NS	NS
18:1n-9	8.1 \pm 0.5	7.0 \pm 0.7	7.1 \pm 0.3	6.2 \pm 0.4	NS	NS	NS
18:1n-7	2.5 \pm 0.0	2.3 \pm 0.3	2.4 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	NS	NS	NS
18:2n-6	9.3 \pm 0.4ab	10.8 \pm 0.1a	8.1 \pm 0.2b	5.4 \pm 0.7c	**	NS	**
18:3n-3	0.4 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	NS	NS	NS
20:4n-6	3.8 \pm 0.3	4.0 \pm 0.6	7.2 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	**	NS	NS
20:5n-3	3.4 \pm 0.7	8.2 \pm 1.3	8.5 \pm 0.5	7.1 \pm 2.5	NS	NS	NS
22:6n-3	1.6 \pm 0.6	4.9 \pm 1.0	6.1 \pm 0.3	6.2 \pm 2.0	*	NS	NS
Σ HUFA ¹	12.2 \pm 2.3	18.6 \pm 2.8	23.2 \pm 0.9	23.6 \pm 3.3	*	NS	NS
Fracción polar							
14:0	2.1 \pm 0.2a	1.8 \pm 0.2a	0.5 \pm 0.0b	1.1 \pm 0.1b	**	NS	*
16:0	16.1 \pm 1.2	15.9 \pm 1.0	16.4 \pm 0.4	17.2 \pm 0.6	NS	NS	NS
18:0	10.8 \pm 1.4	9.2 \pm 0.3	10.0 \pm 0.7	9.7 \pm 0.7	NS	NS	NS
16:1n-7	1.2 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	0.7 \pm 0.0	0.8 \pm 0.0	**	NS	NS
18:1n-9	11.6 \pm 1.3	9.6 \pm 0.6	8.5 \pm 0.2	7.3 \pm 0.3	**	NS	NS
18:1n-7	4.6 \pm 0.6	3.6 \pm 0.0	3.3 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1	*	NS	NS
18:2n-6	22.2 \pm 4.1	26.3 \pm 1.3	12.4 \pm 0.8	11.9 \pm 0.6	**	NS	NS
18:3n-3	1.6 \pm 0.2	1.4 \pm 0.1	2.1 \pm 1.4	0.6 \pm 0.0	NS	NS	NS
20:4n-6	4.2 \pm 0.8	4.1 \pm 0.6	11.0 \pm 1.6	8.4 \pm 0.9	**	NS	NS
20:5n-3	4.5 \pm 0.7b	10.5 \pm 1.6a	13.2 \pm 0.8a	12.7 \pm 0.0a	**	*	**
22:6n-3	1.9 \pm 0.3c	4.3 \pm 0.7b	8.4 \pm 0.3a	8.0 \pm 0.5a	**	NS	*
Σ HUFA ¹	17.7 \pm 6.1	20.1 \pm 3.0	33.1 \pm 1.2	33.0 \pm 2.1	**	NS	NS

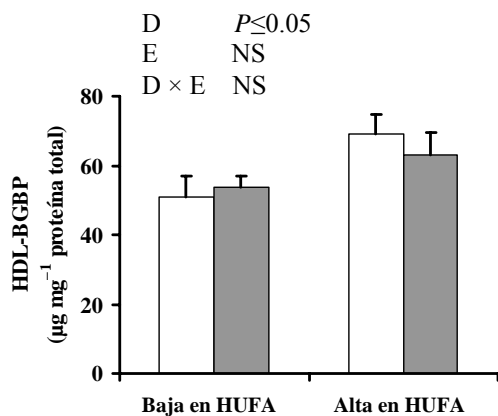
¹Suma de los ácidos grasos altamente insaturados (\geq cuatro doble enlaces); aún incluye los no mostrados en la Tabla.

La concentración de la HDL-BGBP fue significativamente mayor en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA, independientemente de la condición de estrés (promedios globales: $52.5 \pm 3.1 \mu\text{g mg}^{-1}$ de proteínas totales para la dieta baja en HUFA vs. $66.0 \pm 4.3 \mu\text{g mg}^{-1}$ de proteínas totales para la dieta alta en HUFA, Figura 25A). El resto de las variables inmunes analizadas en la hemolinfa no fueron afectadas ni por el estrés de manipulación, ni por el contenido de HUFA en la dieta (Figuras 25B-E).

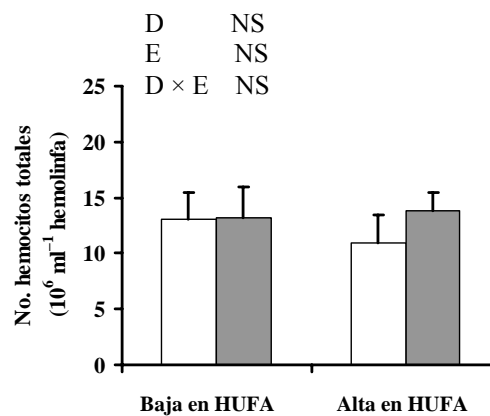
La hemocianina y proteínas totales en hemolinfa mostraron una concentración significativamente menor en los camarones expuestos al estrés de manipulación, comparado con los de control (promedios globales de hemocianina: $82.9 \pm 3.5 \text{ mg ml}^{-1}$ para los camarones de control vs. $73.6 \pm 3.0 \text{ mg ml}^{-1}$ para los camarones estresados; promedios globales de proteínas totales: $112 \pm 2 \text{ mg ml}^{-1}$ para los camarones de control vs. $106.5 \pm 2 \text{ mg ml}^{-1}$ para los camarones estresados, Tabla XVIII). Por otro lado, la concentración de glucosa fue significativamente mayor en los camarones estresados (promedios globales: $14.2 \pm 1.1 \text{ mg dl}^{-1}$ para los camarones de control vs. $23.3 \pm 2.0 \text{ mg dl}^{-1}$ para los camarones estresados). No se observó efecto de las dietas experimentales sobre las variables metabólicas anteriormente mencionadas, pero los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA tuvieron una concentración de lactato significativamente menor (promedios globales: $5.7 \pm 0.3 \text{ mg dl}^{-1}$ para la dieta baja en HUFA vs. $4.8 \pm 0.2 \text{ mg dl}^{-1}$ para la dieta alta en HUFA). No se encontraron efectos del estrés crónico, ni del contenido de HUFA en las dietas sobre las concentraciones de triacilglicéridos, colesterol, lípidos totales, o en la presión osmótica.

En el hepatopáncreas, las variables metabólicas analizadas no fueron significativamente afectadas (Tabla XVIII). En el músculo, la concentración de lactato fue significativamente menor en los camarones estresados comparada con los de control a pesar de las dietas experimentales (promedios globales: $5.8 \pm 0.3 \text{ mg g}^{-1}$ para los camarones de control *vs.* $4.7 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ para los camarones estresados; Tabla XVIII).

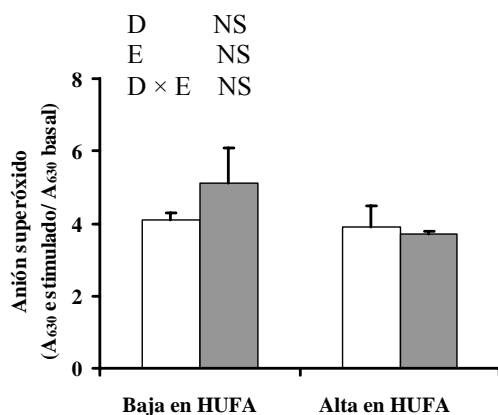
A) Concentración HDL-BGBP



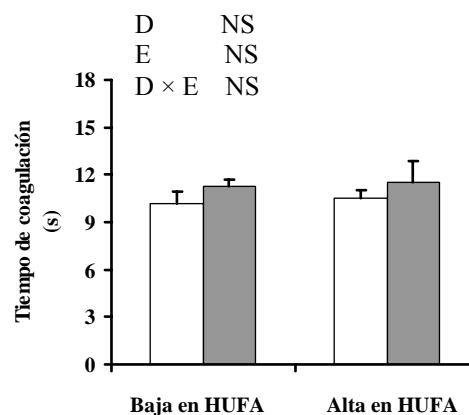
B) Número de hemocitos totales



C) Producción anión superóxido



D) Tiempo de coagulación



E) Actividad SOD en hepatopáncreas

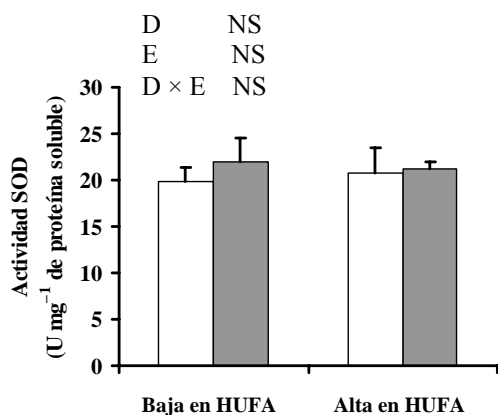


Figura 25. Variables inmunes analizadas en los camarones de los grupos control (barras blancas) y estrés crónico (barras grises) alimentados con las dietas baja y alta en HUFA. Ver Tabla XV para número de ejemplares utilizados. D = Dieta; E = Estrés; NS = No significativo.

Tabla XVIII. Variables metabólicas medidas en los camarones de los grupos control y estrés crónico alimentados con las dietas baja y alta en HUFA. Los datos están presentados como promedio \pm error estándar. Las tres últimas columnas muestran los resultados de los ANOVAs: D = Dieta; E = Estrés; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	Dieta baja en HUFA		Dieta rica en HUFA		D	E	D×E
	Control (n = 15)	Estrés (n = 15)	Control (n = 15)	Estrés (n = 15)			
<i>Hemolinfa</i>							
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	83.5 \pm 4.8	72.1 \pm 4.3	82.3 \pm 5.2	75.1 \pm 4.3	NS	*	NS
Proteínas totales (mg ml ⁻¹)	113.4 \pm 2.8	103.4 \pm 3.1	110.6 \pm 2.8	109.6 \pm 2.2	NS	*	NS
Triacilglicéridos (mg dl ⁻¹)	50.2 \pm 5.7	49.6 \pm 7.8	58.6 \pm 10.1	36.2 \pm 2.4	NS	NS	NS
Colesterol (mg dl ⁻¹)	33.9 \pm 5.0	40.9 \pm 8.8	37.7 \pm 7.7	25.8 \pm 1.8	NS	NS	NS
Lípidos totales (mg dl ⁻¹)	211.5 \pm 30.1	214.8 \pm 40.3	238.2 \pm 44.9	126.4 \pm 10.5	NS	NS	NS
Lactato (mg dl ⁻¹)	5.5 \pm 0.3	5.9 \pm 0.6	5.3 \pm 0.3	4.4 \pm 0.2	*	NS	NS
Glucosa (mg dl ⁻¹)	14.1 \pm 1.4	20.4 \pm 2.2	14.4 \pm 1.8	26.2 \pm 3.3	NS	**	NS
Presión osmótica (mOsm kg ⁻¹)	780.3 \pm 10.7	791.7 \pm 6.9	790.5 \pm 8.8	779.5 \pm 6.9	NS	NS	NS
<i>Hepatopáncreas</i>^Δ							
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	135.0 \pm 13.5	138.5 \pm 5.6	144.6 \pm 5.1	140.4 \pm 4.5	NS	NS	NS
Triacilglicéridos (mg g ⁻¹)	130.2 \pm 20.8	127.7 \pm 19.5	136.0 \pm 25.3	102.1 \pm 16.1	NS	NS	NS
Lípidos totales (mg g ⁻¹)	199.1 \pm 23.9	172.6 \pm 21.2	247.8 \pm 38.7	188.9 \pm 24.1	NS	NS	NS
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	56.8 \pm 10.2	49.2 \pm 2.9	53.2 \pm 5.1	51.8 \pm 3.1	NS	NS	NS
<i>Músculo</i>^Δ							
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	651.6 \pm 12.9	642.8 \pm 15.3	639.8 \pm 12.0	650.1 \pm 26.4	NS	NS	NS
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	63.0 \pm 7.1	52.0 \pm 5.9	53.3 \pm 6.5	44.6 \pm 5.9	NS	NS	NS
Lactato (mg g ⁻¹)	5.8 \pm 0.4	5.1 \pm 0.3	5.9 \pm 0.3	4.3 \pm 0.3	NS	*	NS

^ΔLos resultados están dados en peso seco.

III. 5. 2. Estrés agudo

El estrés agudo y el contenido de HUFA en las dietas afectaron las variables inmunes (Figura 26). Así, un efecto significativo del estrés se observó para el CTH con un incremento significativo una hora después de haber aplicado el estímulo estresor (promedios globales: $12.9 \pm 2.3^b \times 10^6$ hemocitos ml^{-1} para los camarones de control; $20.4 \pm 1.5^a \times 10^6$ hemocitos ml^{-1} a 1 h; $13.9 \pm 1.6^b \times 10^6$ hemocitos ml^{-1} a 24 h; Figura 26A). Aunque la interacción no fue significativa ($P = 0.19$), este efecto fue más pronunciado en los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA. Para la producción de anión superóxido, se obtuvo una interacción significativa observando un incremento 1 h después de haber aplicado el estímulo estresor, pero solamente en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA (Figura 26B). Las dietas experimentales no mostraron efecto sobre el tiempo de coagulación de la hemolinfa, en contraste, dicho tiempo fue significativamente mayor a 1 h que a 24 h después de haber aplicado el estímulo estresor (promedios globales: 12.8 ± 0.8^{ab} s para los camarones de control; 13.7 ± 0.6^b s a 1 h; 11.6 ± 0.4^a s a 24 h; Figura 26C). La actividad de la SOD no fue afectada ni por el estrés de manipulación, ni por el contenido de HUFA en la dieta (Figura 26D).

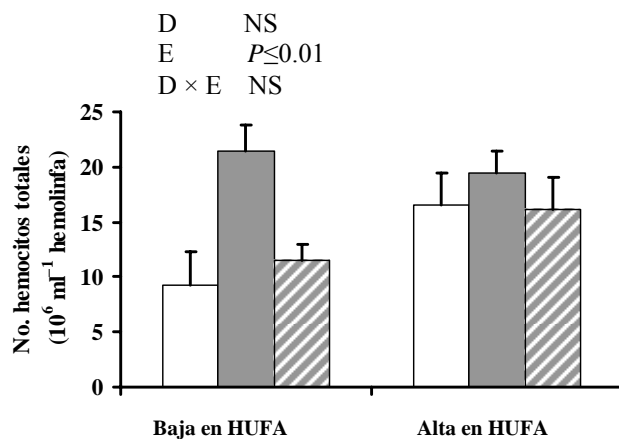
La hemocianina disminuyó significativamente 24 h después de haber aplicado el estímulo estresor (promedios globales: 96.2 ± 4.2^{ab} mg ml^{-1} para los camarones de control; 98.5 ± 4.1^a mg ml^{-1} a 1 h; 82.3 ± 3.6^b mg ml^{-1} a 24 h, Tabla XIX). Por el contrario, la concentración de proteínas totales tuvo un incremento significativo 1 h después de haber estresado los camarones (promedios globales: 106 ± 4.5 mg ml^{-1} para los camarones de control; 135.3 ± 6.2 mg ml^{-1} a 1 h). Desafortunadamente, no fue posible medir la

concentración en proteínas totales a las 24 h debido a un problema técnico. La concentración en proteínas totales también estuvo influenciada por el contenido de HUFA en las dietas, y una concentración significativamente mayor fue observada en los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA (promedios globales: $113.4 \pm 4.4 \text{ mg ml}^{-1}$ para la dieta baja en HUFA vs. $128 \pm 8.3 \text{ mg ml}^{-1}$ para la dieta alta en HUFA). Las concentraciones de lactato y glucosa en la hemolinfa fueron significativamente mayores 1h después de haber estresado los camarones, pero ambas regresaron a niveles similares a los de los camarones control a las 24 h (promedios globales de lactato: $5.7 \pm 0.4^b \text{ mg dl}^{-1}$ para los camarones de control; $7.2 \pm 0.8^a \text{ mg dl}^{-1}$ a 1 h; $5.4 \pm 0.4^b \text{ mg dl}^{-1}$ a las 24 h; promedios globales de glucosa: $16.7 \pm 1.5^c \text{ mg dl}^{-1}$ para los camarones de control; $56.2 \pm 6.5^a \text{ mg dl}^{-1}$ a 1 h; $22.4 \pm 2.8^{bc} \text{ mg dl}^{-1}$ a 24 h). Los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA mostraron una presión osmótica significativamente menor comparada con los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA (promedios globales: $828.9 \pm 12.4 \text{ mOsm kg}^{-1}$ para la dieta baja en HUFA vs. $786.9 \pm 6.1 \text{ mOsm kg}^{-1}$ para la dieta alta en HUFA), pero no se encontró efecto del estrés de manipulación sobre esta variable. Las concentraciones de triacilglicéridos, colesterol y lípidos totales no fueron significativamente afectadas por la condición de estrés, ni por el contenido de HUFA en las dietas experimentales.

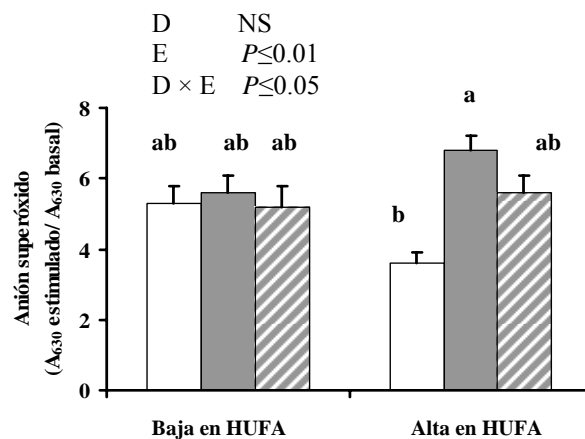
Una interacción significativa se obtuvo para la concentración de proteínas totales en el hepatopáncreas, con valores basales más bajos en los camarones alimentados con una dieta alta en HUFA, que incrementó a la hora de aplicar el estrés, y bajó a las 24 h, mientras que el efecto opuesto se observó para los camarones alimentados con una dieta baja en HUFA (Tabla XIX). En el músculo, la concentración de lactato fue

significativamente mayor en los camarones muestreados 1 h después de haber aplicado el estímulo estresor, y a las 24 h disminuyó a niveles significativamente menores que los camarones de control (promedios globales: 7 ± 0.4^b mg g⁻¹ para los camarones de control; 8.4 ± 0.5^a mg g⁻¹ a 1 h; 5.5 ± 0.4^c mg g⁻¹ a 24 h; Tabla XIX).

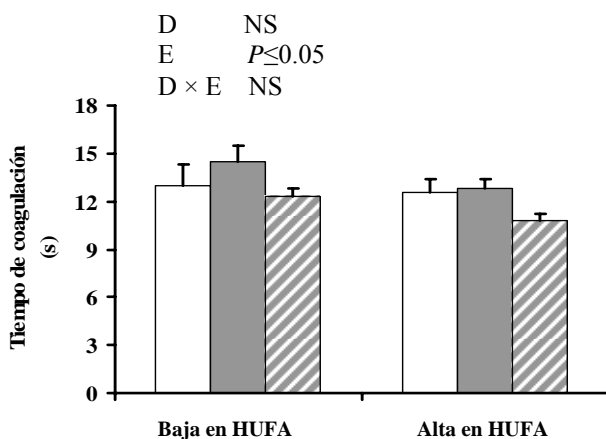
A) Número de hemocitos totales



B) Producción anión superóxido



C) Tiempo de coagulación



D) Actividad SOD en hepatopáncreas

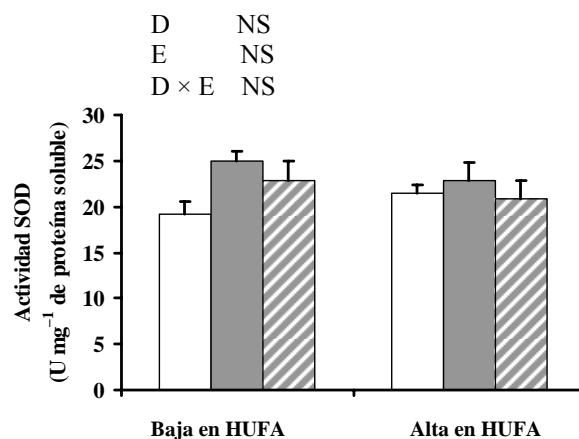


Figura 26. Variables inmunes analizadas en los camarones de los grupos control (barras blancas), 1 h (barras grises) y 24 h (barras ralladas) después de la aplicación del estímulo estresor, alimentados con las dietas baja y alta en HUFA. Ver Tabla XV para número de ejemplares utilizados. D = Dieta; E = Estrés; NS = No significativo.

Tabla XIX. Variables metabólicas medidas en los camarones de los grupos control, 1 h y 24 h después de la aplicación del estímulo estresor, alimentados con las dietas baja y alta en HUFA. Los datos están presentados como promedio \pm error estándar. Las tres últimas columnas muestran los resultados de las ANOVAs: D = Dieta; E = Estrés; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	Dieta baja en HUFA			Dieta alta en HUFA			D	E	D×E
	Control (n = 6)	1 h (n = 6)	24 h (n = 6)	Control (n = 6)	1 h (n = 6)	24 h (n = 6)			
Hemolinfa									
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	96.6 \pm 6.5	95.1 \pm 3.8	77.0 \pm 5.0	95.9 \pm 5.9	102 \pm 7.4	87.7 \pm 4.4	NS	*	NS
Proteínas totales (mg ml ⁻¹)	104 \pm 6	123 \pm 3		108 \pm 7	148 \pm 10		*	**	NS
Triacilglicéridos (mg dl ⁻¹)	61.1 \pm 7.9	73.4 \pm 17.8	59.4 \pm 11.6	60.9 \pm 11.3	54.1 \pm 6.5	82.8 \pm 16.9	NS	NS	NS
Colesterol (mg dl ⁻¹)	43.8 \pm 6.3	53.5 \pm 14.2	45.5 \pm 8.5	46.1 \pm 9.7	39.9 \pm 7.4	60.6 \pm 12.6	NS	NS	NS
Lípidos totales (mg dl ⁻¹)	291 \pm 34	340 \pm 72	307 \pm 67	284 \pm 49	252 \pm 46	381 \pm 63	NS	NS	NS
Lactato (mg dl ⁻¹)	6.2 \pm 0.7	8.5 \pm 0.9	5.3 \pm 0.7	5.2 \pm 0.5	6.0 \pm 1.0	5.5 \pm 0.6	NS	*	NS
Glucosa (mg dl ⁻¹)	16.5 \pm 2.1	60.1 \pm 7.1	18.2 \pm 3.3	16.9 \pm 2.3	52.3 \pm 11.3	26.7 \pm 4.0	NS	**	NS
Presión osmótica (mOsm kg ⁻¹)	814 \pm 18	810 \pm 27	860 \pm 11	776 \pm 6	810 \pm 14	775 \pm 2	**	NS	NS
Hepatopáncreas^Δ									
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	128 \pm 11a	103 \pm 8b	124 \pm 6ab	103 \pm 8b	125 \pm 10ab	105 \pm 4ab	NS	NS	*
Triacilglicéridos (mg g ⁻¹)	121 \pm 37	118 \pm 28	105 \pm 25	132 \pm 39	106 \pm 26	215 \pm 34	NS	NS	NS
Lípidos totales (mg g ⁻¹)	197 \pm 46	186 \pm 30	175 \pm 27	236 \pm 56	182 \pm 34	353 \pm 48	NS	NS	NS
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	41.4 \pm 7.2	33.4 \pm 3.2	39.7 \pm 5.0	34.8 \pm 3.2	50.1 \pm 11.0	29.9 \pm 5.6	NS	NS	NS
Músculo^Δ									
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	625 \pm 16	657 \pm 15	651 \pm 51	697 \pm 17	668 \pm 47	640 \pm 10	NS	NS	NS
Carbohidratos (mg g ⁻¹)	59.5 \pm 6.0	44.3 \pm 5.7	46.6 \pm 8.8	52.4 \pm 8.4	38.2 \pm 9.3	55.6 \pm 4.1	NS	NS	NS
Lactato (mg g ⁻¹)	7.2 \pm 0.6	8.6 \pm 0.6	5.9 \pm 0.6	6.7 \pm 0.4	8.2 \pm 0.9	5.1 \pm 0.6	NS	**	NS

^ΔLos resultados están dados en peso seco.

III. 6. Discusión

III. 6. 1. Desempeño general durante el experimento

Los niveles de HUFA en la dieta empleados en el presente trabajo estuvieron dentro del intervalo usado en otros estudios con juveniles de camarones peneidos (ver Tabla III). En camarón azul *L. stylirostris*, Chim *et al.* (2001) probaron dietas que contenían respectivamente 0.2% y 1.4% de HUFA n-3. En *L. vannamei*, González-Félix *et al.* (2002a) examinaron los requerimientos en HUFA n-3 utilizando dietas con diferentes combinaciones de HUFA y de lípidos (0.5, 1 y 2% de HUFA n-3; 3, 6 y 9% de lípidos) y concluyeron que las dietas con 2% en HUFA n-3 afectaron negativamente el peso final de los camarones después de 6 semanas de experimento. En el presente trabajo, el suplemento de 2.1% de HUFA totales en esta dieta contrarrestó parcialmente el efecto negativo del estrés de manipulación en la sobrevivencia sin influenciar el peso final de los organismos. Posiblemente, eso se debe a que los camarones utilizados para este experimento eran más grandes que los usados por los autores arriba mencionados.

El estímulo estresor crónico afectó el consumo de alimento, la frecuencia de mudas y el peso final de los camarones. El menor peso final observado en los camarones sometidos al estímulo estresor es probablemente el reflejo de una tasa de crecimiento reducida. Al respecto, Pickering (1993) mostró que en peces la disminución del crecimiento es un buen indicador de estrés crónico. Adicionalmente, los camarones expuestos al estímulo mostraron un mayor número de mudas. La combinación de estos dos resultados sugiere que la muda no es automáticamente seguida por un incremento en peso y podría ser estimulada por el estrés de manipulación aplicado de manera crónica. Esta

mayor frecuencia de mudas observada en los camarones estresados contrasta con lo observado en varios estudios: Clark (1986) reportó una inhibición de la muda en *Penaeus semisulcatus* sometido a condiciones de hipoxia durante 17 días. Hewitt y Duncan (2001) registraron una menor tasa de mudas en *M. japonicus* mantenidos a altas temperaturas (36°C) por 12 días. Staples y Heales (1991) observaron un periodo de intermuda mayor en *F. merguensis* sometido a salinidades extremas (5 y 55‰). Sin embargo, un incremento en la frecuencia de mudas fue observado en otras situaciones, como altos niveles de amonio en *M. japonicus* (Chen y Kou, 1992) y baja salinidad (3‰) en cangrejos (instars C5 a C6) del género *Cryptograpsus* (Spivak, 1999). En resumen, se sugiere que el incremento o disminución en la frecuencia de mudas está influenciada por la naturaleza del estímulo estresor.

El menor consumo de alimento observado en los camarones estresados también puede aportar un elemento adicional para explicar que la mayor frecuencia de mudas no fue acompañada por un incremento en peso. Al consumir menos alimento, los camarones estresados tenían menos energía para las distintas funciones fisiológicas, entre ellas la muda que fue más frecuente en estos organismos. A su vez y dado que el proceso de muda requiere de una gran cantidad de energía (Sánchez-Paz *et al.*, 2007), los camarones sometidos a estrés aparentemente no contaron con suficiente energía para crecer. El menor consumo de alimento podría ser explicado en parte por cierto nivel de daño físico provocado por el estrés crónico, así como la mayor frecuencia de mudas observada, ya que los camarones dejan de comer justo antes y después de la muda (Sánchez-Paz *et al.*, 2007). El contenido de HUFA en la dieta influyó también el consumo de alimento ya que éste

fue menor para los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA. Este resultado llama la atención, ya que generalmente los aceites de pescado, ricos en HUFA, son utilizados como atrayentes en la industria que fabrica alimentos balanceados para camarón. Una concentración alta de HUFA pudo resultar en un sabor poco atractivo para los camarones. Por otro lado, un consumo menor de alimento con alta proporción de HUFA podría indicar que los camarones satisfacen sus necesidades con menor alimento cuando este tiene mayor cantidad de ácidos grasos polinsaturados.

III. 6. 2. Composición de ácidos grasos en los hemocitos

Los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA mostraron una mayor proporción de HUFA en los lípidos neutros y polares de sus hemocitos. Las proporciones de AA, EPA y DHA consideradas por separado, también se incrementaron tanto en los lípidos neutros como polares de los hemocitos. En *L. vannamei*, la incorporación de los HUFA de la dieta en tejidos había sido reportada en el hepatopáncreas (González-Félix *et al.*, 2002a; b; 2003; Palacios *et al.*, 2004; Hurtado *et al.*, 2006), músculo (González-Félix *et al.*, 2002a; b; 2003) y branquias (Palacios *et al.*, 2004; Hurtado *et al.*, 2006). El presente estudio demuestra por primera vez que los HUFA administrados en la dieta se incorporan también en los hemocitos de los camarones. Adicionalmente, los HUFA parecen acumularse selectivamente en los hemocitos cuando son requeridos para funciones particulares. Esto se observó en los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA y sometidos al estímulo estresor, ya que mostraron una mayor proporción de EPA y DHA en los lípidos neutros y polares de sus hemocitos en comparación con los camarones del grupo

control. Lo anterior indica la capacidad de los camarones para retener estos dos tipos de HUFA a pesar de su bajo contenido en la dieta. Es posible que el EPA y el DHA desempeñen una función biológica importante en los hemocitos de los camarones ante una condición de estrés crónico. Kanazawa (1997) reportó que un suplemento de DHA en la dieta tuvo un efecto positivo sobre la tolerancia de las larvas del pez *Pagrus major* ante varias condiciones estresantes como temperatura y salinidad extrema, exposición al aire y bajo nivel de oxígeno disuelto. Es hasta cierto punto reconocido que un suplemento de HUFA en la dieta de postlarvas de camarón incrementa su supervivencia ante pruebas de estrés por salinidad (para revisión ver Palacios y Racotta, 2007).

III. 6. 3. Efecto de los HUFA en la respuesta inmune

Una de las hipótesis del presente trabajo fue que los HUFA presentes en la dieta modificarían la composición lipídica de los hemocitos y podrían mejorar el potencial de defensa inmune del camarón. En el presente estudio, no se encontraron efectos de los HUFA sobre las variables inmunes relacionadas con los hemocitos (CTH, producción de anión superóxido y tiempo de coagulación de la hemolinfa), con excepción del incremento de la producción de anión superóxido en condiciones de estrés agudo. Este aumento en la producción de anión superóxido está probablemente relacionado con una mayor proporción de HUFA en los hemocitos de los camarones. Aunque en el experimento de estrés agudo, no se determinó la composición de ácidos grasos en los hemocitos, se asume que antes de aplicar el estímulo estresor, dicha composición debía ser similar a la de los camarones de control del experimento de estrés crónico. Con una alta proporción de AA esperaríamos

encontrar un aumento en la producción de anión superóxido como resultado de la dieta, ya que el AA es un precursor del leucotrieno LTB₄, el cual tiene la capacidad de producir “especies” reactivas del oxígeno en mamíferos (Calder, 2001). Por otro lado, el DHA y el EPA también pudieron jugar un papel importante en la capacidad de producir anión superóxido. En el caso particular del EPA, Delaporte *et al.* (2003) propusieron que este ácido graso puede proveer de energía a los hemocitos y en consecuencia una mayor capacidad para responder a los estímulos, lo cual podría aumentar la capacidad de producción de anión superóxido.

Otra hipótesis de este trabajo fue que el suplemento de HUFA modificaría la concentración de la HDL-BGBP, lo cual podría fortalecer el sistema de respuesta inmune de los camarones cuando están expuestos a patógenos. Esta hipótesis se verificó en el experimento de estrés crónico donde los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA (tanto los de estrés como los de control) mostraron un incremento en su concentración de HDL-BGBP. Aunque no se cuantificó, se sugiere que el suplemento de HUFA en la dieta estimuló la síntesis de HDL-BGBP en el hepatopáncreas, dado que es el órgano donde se sintetiza esta lipoproteína (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000). Sin embargo, se deberá confirmar este supuesto en estudios futuros.

III. 6. 4. Efecto del estímulo estresor sobre la respuesta inmune

El estímulo estresor aplicado diariamente (estrés crónico) no alteró la respuesta inmune de los camarones. Un resultado similar ya se había obtenido en el experimento del capítulo I, donde se sugirió que los camarones pudieron haberse adaptado al estímulo

estresor. En el presente experimento, se aumentó la magnitud del estímulo estresor y semanalmente se incrementó el tiempo de emersión para contrarrestar la posible adaptación al estrés, pero nuevamente no se observó algún efecto en las variables inmunes. Por el contrario, el estímulo estresor aplicado de manera puntual (estrés agudo) afectó el CTH y el tiempo de coagulación de la hemolinfa. El alto CTH obtenido 1 h después de haber aplicado el estímulo estresor en los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA, no concuerda con algunos trabajos que reportan una disminución de esta variable en crustáceos sometidos a condiciones de estrés (Le Moullac *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Perazzolo *et al.*, 2002). Sin embargo, en estos trabajos el CTH se determinó de 24 h hasta 28 días después del inicio de la aplicación del estímulo estresor y no 1 h después de éste. En cambio, los resultados del presente estudio si concuerdan con los de Jussila *et al.* (2001), quienes observaron un incremento en el CTH una hora después de haber inducido la actividad nadadora por dos minutos de las larvas de langosta *Panulirus cygnus*.

En el presente estudio, el tiempo de coagulación se incrementó una hora después de haber aplicado el estímulo estresor y disminuyó a las 24 horas. Este incremento pudo deberse a una disminución particular de los hemocitos hialinos en la hemolinfa, ya que se reportó que participan en el proceso de coagulación. Estos hemocitos intervienen liberando transglutaminasa dependiente de iones de calcio que cataliza la polimerización de proteínas coagulantes presentes en el plasma (Lee y Söderhäll, 2002). Sin embargo, para verificar la explicación anterior, se hubiera tenido que hacer un conteo diferencial de hemocitos.

III. 6. 5. Respuesta metabólica

Un fuerte incremento en la concentración de glucosa fue observado en la hemolinfa de los camarones 1 h después de haber sido sometidos al estímulo estresor en el experimento de estrés agudo. Como se mencionó en el capítulo I, la hiperglicemia es una respuesta comúnmente observada después de exponer a los camarones peneidos a diferentes tipos de estresores puntuales. Altas concentraciones de glucosa también se observaron en camarones sometidos al estímulo estresor en el experimento de estrés crónico. Sin embargo, las concentraciones en glucosa no alcanzaron los niveles relativos (más del doble), ni absolutos (más de 30 mg dl⁻¹) que generalmente se han reportado para camarones sometidos a condiciones de estrés agudo. Estos resultados apoyan la idea de que el aumento en las concentraciones de glucosa durante un estrés crónico puede no ser tan pronunciado como el que ocurre durante un estrés agudo, lo cual había sido sugerido en el capítulo I.

Un ligero incremento en la concentración de lactato se observó solamente en la hemolinfa y músculo de los camarones 1 h después de haber sido sometidos al estímulo estresor agudo. Este resultado confirma lo que previamente habían observado Racotta y Palacios (1998), así como Mugnier y Justou (2004) quienes mencionaron que el lactato es un indicador de estrés menos sensible que la glucosa, al menos en ciertas condiciones. De manera interesante, los camarones alimentados con la dieta alta en HUFA y sometidos al estímulo estresor crónico, mostraron una menor concentración de lactato en la hemolinfa. Se sugiere que los altos niveles de HUFA en la dieta pudieron haber contrareestado el incremento de lactato producido por el estrés intrínseco del muestreo. Este efecto también

fue parcialmente observado en el experimento de estrés agudo, ya que el incremento del lactato a 1 h fue mayor en los camarones alimentados con la dieta baja en HUFA, comparado con los alimentados con la dieta alta, aún si no se detectó una interacción significativa.

Para soportar el estímulo estresor en el experimento de estrés crónico, los camarones parecen haber utilizado las proteínas como fuente de energía, lo cual podría explicar también los resultados obtenidos del peso final que se discutieron anteriormente. De manera interesante, los lípidos totales, y particularmente los triacilglicéridos, parecen no haber sido usados como fuente significativa de energía. La capacidad de los camarones de cultivo para utilizar a las proteínas como fuente de energía fue señalada por Rosas *et al.* (2002), quienes mencionaron también que éstas son empleadas para el crecimiento, la osmoregulación, así como para producir glucógeno y glucosa a través de la ruta gluconeogénica. La disminución de proteínas totales observada en el experimento de estrés crónico puede también revelar una respuesta del sistema inmune al estrés, ya que éste depende fuertemente de las proteínas. Asimismo, la disminución de hemocianina podría ser interpretada como una respuesta metabólica e inmunológica al estrés, debido a que en crustáceos esta proteína está involucrada en varias funciones como el transporte de oxígeno, almacenamiento de proteínas (Paul y Pirow, 1998), regulación osmótica (Paul y Pirow, 1998), defensa contra hongos (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001) y tiene una actividad parecida a la fenol-oxidasa (Adachi *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2005).

DISCUSIÓN GENERAL

B. 1. Estrés crónico

En el presente trabajo, el estrés crónico inducido por manipulación afectó hasta cierto punto la condición fisiológica del camarón blanco. Lo anterior se observó en algunas variables del desempeño biológico como son el peso, la supervivencia, el consumo de alimento, o la ocurrencia de mudas (capítulos I y III). Estos resultados tienen implicaciones directas para el cultivo de camarón, ya que podría representar una pérdida importante de biomasa y/o un incremento en el tiempo de producción, los cuales implican pérdidas económicas para la camaronicultura. Así mismo, los resultados obtenidos sugieren que las variables anteriores pueden ser usadas como herramientas para detectar una condición de estrés crónico en un cultivo. Sin embargo, como se discutió en el capítulo III, es probable que el tipo de estímulo influya en la respuesta al estrés de manera particular, por lo que se debería verificar este resultado aplicando diferentes tipos de estímulos.

Dentro de las variables metabólicas, la glucosa y el lactato no resultaron ser buenos indicadores de la condición de estrés crónico aplicado, mientras que se confirmó que sí lo son bajo una condición de estrés agudo utilizando el mismo estímulo estresor. Por lo anterior, se concluye en la presente tesis que la glucosa y el lactato son dos variables más apropiadas para detectar condiciones de estrés agudo, pero no crónico. En estudios paralelos, se ha observado que la concentración en lactato aumenta rápidamente después de un estímulo estresor (desde un minuto a menos de una hora) y que la concentración en glucosa aumenta posteriormente (menos de una hora a un par de horas) (Racotta,

comunicación personal). Por otro lado, ante situaciones de estrés agudo por manipulación con atarraya a partir del estanque y confinamiento en cubeta, la concentración de lactato puede aumentar hasta 20 veces mientras que la de glucosa solo de 2 a 3 veces (Racotta, comunicación personal). Al respecto, existe bastante controversia sobre la “utilidad” o el significado de los niveles respectivos de lactato y glucosa como indicadores de estrés (Racotta y Palacios, 1998; Mugnier y Justou, 2004). Se requieren más trabajos para delimitar los tipos de estímulos y tiempos post-estímulo característicos de una o ambas variables metabólicas para poder utilizarlas rutinariamente como indicadores de estrés a corto plazo.

El estímulo crónico en los capítulos I y III se aplicó una vez por las mañanas durante un periodo prolongado (varias semanas), pero no fue constante o aplicado durante todo el día. Este aspecto es importante, ya que también es posible que un incremento en las concentraciones de glucosa y lactato se produjera diariamente posterior al estímulo, pero no se mantuvo a lo largo del periodo experimental. Por su parte, las concentraciones en proteínas totales y hemocianina en hemolinfa parecen ser las más adecuadas para detectar una condición de estrés crónico. La concentración en lípidos totales en la hemolinfa podría ser también considerada como una buena herramienta para monitorear el estado de estrés, aunque no resultó ser significativamente diferente en el experimento de estrés crónico del capítulo III. Por otro lado, los resultados del capítulo I muestran que la capacidad de respuesta metabólica del camarón blanco sometido a una condición de estrés crónico puede variar según las condiciones ambientales.

El estrés crónico provocado por manipulación no parece haber afectado la capacidad de respuesta inmune de los camarones. La ausencia de efecto en las variables inmunes medidas en este estudio puede ser atribuida a una adaptación de los camarones al estímulo estresor, a pesar de que este último fue intensificado cada semana en el capítulo III. Al igual que para las variables metabólicas, y tal y como se discutió entre los capítulos I y III, la naturaleza del estímulo estresor también parece ser crucial dado que diferentes tipos de estrés ambiental sí producen una disminución en la capacidad de respuesta inmune, como el CTH (Le Moullac *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Perazzolo *et al.*, 2002). Sin embargo hasta este trabajo, no se habían analizado los efectos del estrés por manipulación, aunque solo se consideraron algunas variables o efectores del sistema inmune. Por lo anterior, se sugiere para trabajos posteriores el contemplar adicionalmente otro tipo de variables inmunes, y de manera particular las que están relacionadas con la respuesta celular de los hemocitos, como son la capacidad de adhesión, de encapsulación o de fagocitosis, por citar algunas. También, se recomienda la determinación de la actividad de la superóxido dismutasa en el plasma y en los hemocitos más que en el hepatopáncreas y músculo. Además, se propone evaluar la capacidad de respuesta inmune del camarón bajo condiciones de estrés crónico a través de un reto viral.

B. 2. Ácidos grasos altamente insaturados

El presente estudio demostró que los HUFA administrados a través de la dieta se incorporan tanto en el músculo, como en los hemocitos de los camarones. En el caso de los hemocitos, se observó también que los HUFA parecen acumularse selectivamente cuando

los camarones están sometidos a una condición de estrés crónico y a pesar de ser alimentados con una dieta baja en HUFA. Sin embargo, como consecuencia de este resultado no se observó un efecto sobre las variables inmunes directamente relacionadas con los hemocitos de los camarones (experimento de estrés crónico). La variable inmune que mostró ser afectada por el contenido de HUFA en la dieta fue la HDL-BGBP. Aunque se desconoce actualmente el mecanismo por el cual el suplemento de HUFA incrementa la concentración de esta lipoproteína, este resultado es de gran importancia, ya que podría fortalecer el sistema de respuesta inmune de los camarones cuando están expuestos a hongos. Sin embargo, existe todavía incertidumbre sobre la dualidad de las funciones de la HDL-BGBP y se propuso que en la jaiba azul *Callinectes sapidus* la participación de esta lipoproteína en la función inmune es mayor durante el desarrollo embrionario y que la función en el transporte de lípidos es más importante en etapas juvenil y adulto (Walker *et al.*, 2003). Investigaciones sobre este punto en el camarón blanco son necesarias. A raíz de este estudio, se plantea determinar la composición en ácidos grasos de la HDL-BGBP en camarones alimentados con diferentes niveles de HUFA en su dieta. De esta manera, se pretende verificar la capacidad de esta lipoproteína para acumular HUFA. En el caso de que se confirme esta hipótesis, la mayor flexibilidad de esta molécula podría mejorar el reconocimiento de la HDL-BGBP con los β -glucanos primero, y enseguida con los receptores presentes en los hemocitos. Como se propuso anteriormente, otras variables inmunes relacionadas con la respuesta celular de los hemocitos podrían considerarse para el estudio del efecto de los HUFA sobre la capacidad de respuesta inmune.

El suplemento de HUFA mostró tener un efecto sobre algunas variables del desempeño biológico. En el capítulo II, las dietas que contenían un nivel medio y alto en HUFA favorecieron la ganancia de peso de los camarones mientras que en el capítulo III, la dieta alta en HUFA contrarrestó parcialmente el efecto negativo del estrés de manipulación en la supervivencia.

CONCLUSIONES

- 1) El estrés crónico por manipulación produjo una disminución en las concentraciones de proteínas totales y hemocianina en hemolinfa, a diferencia de las concentraciones de glucosa y lactato que no se vieron afectadas. Estos resultados tienen implicaciones para establecer indicadores de estrés a largo plazo.
- 2) La respuesta metabólica de estrés no fue la misma en dos sistemas experimentales y difirieron entre sí principalmente por la disponibilidad de alimento natural y la perturbación de los organismos.
- 3) De manera general, el desempeño biológico del camarón blanco en términos de crecimiento y supervivencia fue menor ante una condición de estrés crónico por manipulación.
- 4) El estrés crónico por manipulación no afectó las variables inmunes medidas en este estudio, y contrasta con la influencia de distintos tipos de estresores ambientales reportada en la bibliografía.
- 5) Los HUFA administrados en la dieta incrementaron la concentración de la HDL-BGBP, lo cual debe favorecer el reconocimiento de los hongos y aumentar la eficiencia de los mecanismos de defensa inmune.
- 6) El suplemento en HUFA disminuyó la concentración de lactato en la hemolinfa de los camarones sometidos a la condición de estrés crónico, lo cual podría sugerir una menor susceptibilidad al estrés.

- 7) A partir de las variables inmunes medidas, no se observó que el suplemento de HUFA en la dieta mejore la capacidad de respuesta inmune del camarón ante una condición de estrés crónico, a excepción del incremento de la HDL-BGBP.
- 8) Los HUFA administrados a través de la dieta se incorporaron tanto en el músculo como en los hemocitos de los camarones. Además, se observó la acumulación selectiva de HUFA en los hemocitos cuando los camarones estaban sometidos a una condición de estrés crónico, a pesar de que fueron alimentados con una dieta baja en HUFA.
- 9) Los HUFA administrados a través de la dieta afectaron algunas variables del desempeño biológico favoreciendo la ganancia en peso y ayudando a contrarrestar el efecto negativo del estrés por manipulación sobre la supervivencia.

REFERENCIAS

- Adachi, K., Hirata, T., Nagai, K., Sakaguchi, M., 2001. Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. J. Food Sci. 66, 1130-1136.
- Adachi, K., Wakamatsu, K., Ito, S., Miyamoto, N., Kokubo, T., Nishioka, T., Hirata, T., 2005. An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis. Pigment Cell Res. 19, 214-219.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., 1989. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. En: Texas Shrimp Farming Manual, vol. 1: Grow-out Technology. Texas Agricultural extension Service and Texas A&M University, Sea Grant College Program, 50p.
- Anuario estadístico de pesca 1990, 1991. Dirección general de informática y registros pesqueros. Secretaría de pesca, 127p.
- Anuario estadístico de pesca 1991, 1992. Dirección general de informática y registros pesqueros. Secretaría de pesca, 128p.
- A.O.A.C., 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16^o edición. Cunniff, P. (ed.). Arlington, VA, USA, Capítulo 4, 30p.
- Ashton, I., Clements, K., Barrow, S.E., Secombes, C.J., Rowley, A.F., 1994. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocytes. Biochim. Biophys. Acta 1214, 253-262.

- Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3-11.
- Bachère, E., Miahle, E., Rodríguez, J., 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and application. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 597-612.
- Bachère, E., Destoumieux, D., Bulet, P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191, 71-88.
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., Romestand, B., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149-168.
- Barnes, H., Blackstock, J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for “total” lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12, 103-118.
- Bauchau, A.G., 1981. Crustaceans. En: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (ed.). *Invertebrates blood cells*. Academic Press, New York, NY, U.S.A., 385-420.
- Bell, T.A., Lightner, D.V., 1988. *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 52-57.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-253.

- Cahu, C., Guillaume, J.C., Stéphan, G., Chim, L., 1994. Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. *Aquaculture* 126, 159-170.
- Cahu, C.L., Cuzan, G., Quazuguel, P., 1995. Effect of highly unsaturated fatty acids, alpha-tocopherol and ascorbic acid in broodstock diet on egg composition and development of *Penaeus indicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A, 417-424.
- Calder, P.C., 1998. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 467-490.
- Calder, P.C., 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutr. Res.* 21, 309-341.
- Calder, P.C., 2006. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostag. Leukot. Ess.* 75, 197-202.
- Camba, E., Pedrazzoli, A., Yaguachi, M., Akiyama, D.M., 1993. Requerimiento de proteínas en dietas artificiales para juveniles de *Penaeus vannamei*. *Acuicult. Trop.* 1, 7-12.
- Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., De Philippis, R., Ascencio, F., 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 353-366.
- Carrillo, O., Zaldívar, C., Rosas, C., 2006. Marcadores de situación nutricional y de salud. En: Rosas, C., Carrillo, O., Wilson, R., Andreatta, E.R. (ed.). Subprograma II.

- Acuicultura. Red temática II.C. Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en iberoamérica. México, DF, México, 106-122.
- Carta pesquera, 2004. Diario oficial de la federación, 15 de marzo 2004, cuarta sección, p34.
- Carta pesquera, 2006. Diario oficial de la federación, 25 de agosto 2006, segunda sección, 84-86.
- Castell, J.D., 1983. Fatty acid metabolism in crustaceans. En: Pruder, G.D., Langdon, C.J., Conklin, D.E. (ed.). Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition: biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, 124-145.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev. 198, 116-126.
- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Lo, C.F., Kou, G.H., Liao, I.C., 1999. Effect of dietary β -1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org. 36, 163-168.
- Chang, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S., Liao, I.C., 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 10, 505-514.
- Charmantier, G., Soyeux, C., 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 178, 233-246.

- Chen, J.C., Cheng, S.Y., Chen, C.T., 1994. Changes of hemocyanin, protein and free aminoacid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 339-347.
- Chen, J.C., Kou, Y.Z., 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture* 104, 249-260.
- Cheng, W., Liu, C.H., Hsu, J.P., Chen, J.C., 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 351-365.
- Cheng, W., Liu, C.H., Yeh, S.T., Chen, J.C., 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunol.* 17, 41-51.
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C., 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunol.* 18, 1-12.
- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Le Moullac, G., Galois, R., Martin, J.L.M., 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of *Penaeid* prawns to environmental stress? *Aquacult. Res.* 32, 91-94.
- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.* 267, 1244-1252.

- Clare, A.S., Lumb, G., 1994. Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Mar. Biol. 118, 601-610.
- Clark, J.V., 1986. Inhibition of moulting in *Penaeus semisulcatus* (De Haan) by long-term hypoxia. Aquaculture 52, 253-254.
- Coppack, S.W., Jensen, M.D., Miles, J.M., 1994. In vivo regulation of lipolysis in humans. J. Lip. Res. 35, 177-193.
- Corraze, G., 1999. Nutrition lipidique. En: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. (ed.). Nutrition et alimentation des poissons et crustacés. INRA éditions-Ifremer, France, 147-170.
- D'Abramo, L.R., 1997. Triacylglycerols and fatty acids. En: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (ed.). Crustacean nutrition: advances in world aquaculture. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, vol. 6, 71-84.
- Dalla Via, G.J., 1986. Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. II. Free amino acids. Aquaculture 55, 307-316.
- Das, U.N., 1991. Interactions between essential fatty acids, eicosanoids, cytokines, growth factors and free radicals: relevance to new therapeutic strategies in rheumatoid arthritis and other collagen vascular diseases. Prostag. Leukot. Ess. 44, 201-210.
- de Pablo, M.A., Puertollano, M.A., Álvarez de Cienfuegos, G., 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 945-950.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C., Samain J.F., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune

- functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*.
J. Exp. Biol. 206, 3053-3064.
- Delaporte, M., Chu, F.L., Langdon, C., Moal, J., Lambert, C., Samain, J.F., Soudant, P.,
2007. Changes in biochemical and hemocyte parameters of the Pacific oysters
Crassostrea gigas fed T-Iso supplemented with lipid emulsions rich in
eicosapentaenoic acid. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 343, 261-275.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Bulet, P., Bachère, E., 2000a. Penaeidins, a family of
antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). Cell. Mol. Life
Sci. 57, 1260-1271.
- Destoumieux, D., Muñoz, M., Cosseau, C., Rodriguez, J., Bulet, P., Comps, M., Bachère,
E., 2000b. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are
produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge.
J. Cell Sci. 113, 461-469.
- Destoumieux-Garzón, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachère, E.
2001. Crustacean Immunity. Antifungal peptides are generated from the C-terminus
of shrimp hemocyanin response to microbial challenge. J. Biol. Chem. 276, 47070-
47077.
- Duvic, B., Söderhäll, K., 1992. Purification and partial characterization of a β -1,3-glucan-
binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus*
leniusculus. Eur. J. Biochem. 207, 223-228.
- FAO, 2002. Yearbook of fishery statistics. Aquaculture production. FAO Statistics vol. 90,
No 2, Roma, Italia, 1-30.

- FAO Stat., 2006. Sitio en línea, fecha de acceso 12 de febrero 2006.<http://faostat.fao.org/>
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E., Niem, V.H., 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental, vol.1. Plantas e invertebrados. FAO, Roma, Italia, 646p.
- González-Félix, M.L., Perez-Velazquez, M., 2002. Current status of lipid nutrition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (ed.). Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI simposium internacional de nutrición acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, QR, México, 35-45.
- González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Perez-Velazquez, M., 2002a. Effect of various dietary lipid levels on quantitative essential fatty acid requirements of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 33, 330-340.
- González-Félix, M.L., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M., Perez-Velazquez, M., 2002b. Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. Aquaculture 205, 325-343.
- González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Perez-Velazquez, M., 2002c. Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture 207, 151-167.
- González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Perez-Velazquez, M., 2003. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus*

- vannamei*: II. Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival, and fatty acid composition. *Aquacult. Nutr.* 9, 115-122.
- Goytortúa Bores, E., 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría, Universidad de Colima, Col., México, 88p.
- Guzmán, C., Gaxiola, G., Rosas, C., Torre-Blanco, A., 2001. The effect of dietary protein and total energy content on the digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) postlarvae. *Aquacult. Nutr.* 7, 113-122.
- Hagerman, L., 1986. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A, 721-724.
- Haglund, O., 1993. Effects of fish oil on risk factors for cardiovascular disease. *Ups. J. Med. Sci.* 98, 89-148.
- Hall, M.R., van Ham, E.H., 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 290-299.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., Delaporte, M., Alix, J.H., Smith, B.C., Dixon, M.S., Quère, C., Le Coz, J.R., Paillard, C., Moal, J., Samain, J.F., 2004. Immunological competence of eastern oysters, *Crassostrea virginica*, fed different microalgal diets and challenged with a temperature elevation. *Aquaculture* 234, 541-560.

- Hernández-López, J., Gollas-Gálvan, T., Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C, 61-66.
- Hernández-Saavedra, N.Y., 1997. Characterization of the superoxide dismutase enzyme type copper-zinc from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*, and cloning of the encoding sequence from cDNA. Tesis de doctorado, CIBNOR, La Paz, BCS, México, 40p.
- Hewitt, D.R., Duncan, P.F., 2001. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquacult. Res.* 32, 305-313.
- Hurtado, M.A., Racotta, I.S., Arjona, O., Hernández-Rodríguez, M., Goytortúa, E., Civera, R., Palacios, E., 2006. Effect of hypo- and hyper-saline conditions on osmolarity and fatty acid composition of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) fed low- and high-HUFA diets. *Aquacult. Res.* 37, 1316-1326.
- ICES, 1997. Report of the working group on marine fish culture for the international council for the exploration of the sea. Murcia, España 23-26, Junio 1997. ICES CM 1997/F:7.
- Jiménez-Vega, F., Sotelo-Mundo, R.R., Ascencio, F., Vargas-Albores, F., 2002. 1,3- β -D glucan binding protein (BGBP) from the white shrimp, *Penaeus vannamei*, is also a heparin binding protein. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 171-181.
- Johansson, M.W., Söderhäll, K., 1989. Cellular immunity in crustacean and the proPo system. *Parasitol. Today* 5, 171-176.

- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Jussila, J., McBride, S., Jago, J., Evans, L.H., 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Aquaculture* 199, 185-193.
- Kanazawa, A., 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* 155, 129-134.
- Kanazawa, A., Teshima, S. I., Endo, M., 1979. Requirements of prawn, *Penaeus japonicus*, for essential fatty acids. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 28, 27-33.
- Karnovsky, M.A., 1965. Formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137.
- Kiron, V., Hideo, F., Toshio, T, Watanabe, T., 1995. Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A, 361-367.
- Kitani, H., 1986. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52, 1131-1139.
- Kontara, E., Coutteau, P., Sorgeloos, P., 1997. Effect of dietary phospholipids for an incorporation of n-3 highly unsaturated fatty acids in postlarval *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 158, 305-320.
- Koskela, R.W., Greenwood, J.G., Rothlisberg, P.C., 1992. The influence of prostaglandin E₂ and the steroid hormones, 17 α -hydroxyprogesterone and 17 β -estradiol on

- moulting and ovarian development in the tiger prawn; *Penaeus esculentus* Haswell, 1879 (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 101A, 295-299.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 421-437.
- Léger, P., Sorgeloos, P., 1992. Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries. En: Fast, A.W., Lester, L.J. (ed.). *Marine Shrimp Culture: Principles and practices*. Elsevier Publishers, NY, USA, 225-244.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle – protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 227-234.
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 621-629.
- Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121-131.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201-220.
- Lignot, J.H., Trilles, J.P., Charmantier, G., 1997. Effect of an organophosphorus insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 128, 307-316.

- Lignot, J.H., Cochard, J.C., Soyeux, C., Lemaire, P., Charmantier, G., 1999. Haemolymph osmolality according to nutritional status, molting stage and body weight of *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 170, 79-92.
- Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209-245.
- Lim, C., Ako, H., Brown, C.L., Hahn, K., 1997. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* fed different sources of dietary lipid. *Aquaculture* 151, 143-153.
- Livingstone, D.R., 1985. Biochemical measurements. En: Bayne, B.L. (ed.). The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York, NY, USA, 81-132.
- Liu, C.H., Chen, J.C., 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 321-334.
- Marangos, C., Brogren, C.H., Alliot, E., Ceccaldi, H.J., 1989. The influence of water salinity on the free amino acid concentration in muscle and hepatopancreas of adult shrimps, *Penaeus japonicus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 589-594.
- Martin, G.G., Graves, B.L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J. Morphol.* 185, 339-348.
- Martínez-Córdova, L. R., 2002. Camaronicultura. Avances y tendencias. AGT Editor, S. A. México, 167p.

- McCord, J., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6046-6055.
- McEwen, B.S., Seeman, T., 1999. Protective and damaging effects of mediators of stress: elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 896, 30-47.
- McEwen, B.S., 1998. Stress, adaptation and disease: allostasis and allostatic load. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 840, 33-44.
- Méndez, M., 1981. Claves de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea: Decapada) del mar y ríos de la costa del Perú. Instituto del mar del Perú, Boletín vol.5, 170p.
- Mendoza, R. 1992. Etude de la vitellogenèse et de sa stimulation chez les crevettes péneidés par des facteurs hétérologues et homologues. Tesis de doctorado. Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 200p.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, Á.I., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R., Racotta, I.S., 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258, 633-640.
- Mercier, L., Racotta, I.S., Yepiz-Plascencia, G., Muhlia-Almazán, A., Civera, R., Quiñones-Arreola, M.F., Wille, M., Sorgeloos, P., Palacios, E., 2007. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to handling stress. *Aquaculture*, *submitted*.

- Millamena, O.M., Bombeo, R.F., Jumalon, N.A., Simpson, K.L., 1988. Effects of various diets on the nutritional value of *Artemia* sp. as food for the prawn *Penaeus monodon*. Mar. Biol. 98, 217-221.
- Montero, D., Socorro, J., Tort, L., Caballero, M.J., Robaina, L.E., Vergara, J.M., Izquierdo, M.S., 2004. Glomerulonephritis and immunosuppression associated with dietary essential fatty acid deficiency in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., juveniles. J. Fish Dis. 27, 297-306.
- Mugnier, C., Justou, C., 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 309, 35-46.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2005. Starvation and diet composition affect mRNA levels of the high density-lipoprotein- β glucan binding protein in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 142B, 209-216.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E., 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture 191, 89-107.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2000. Lehninger principles of biochemistry, 3ra edición. Worth Publishers, New York, NY, USA, 1152p.
- Otoshi, C.A., Montgomery, A.D., Look, A.M., Moss, S.M., 2001. Effects of diet and water source on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 32, 243-249.

- Páez-Osuna, F., 2001. The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects and mitigating alternatives. *Environ. Man.* 28, 131-140.
- Páez-Osuna, F., Gracia, A., Flores-Verdugo, F., Lyle-Fritch, L.P., Alonso-Rodríguez, R., Roque, A., Ruiz-Fernández, A.C., 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Poll. Bull.* 46, 806-815.
- Palacios, E., Racotta, I.S., 2007. Salinity stress test in shrimp postlarvae: Relation to further performance and physiological basis. *Aquaculture* 268, 123-135.
- Palacios, E., Bonilla, A., Pérez, A., Racotta, I.S., Civera, R., 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 299, 201-215.
- Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C., 2003a. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar. Biol.* 142, 735-745.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C., 2003b. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637-650.
- Paul, R.J., Pirow, R., 1998. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. *Zoology* 100, 319-327.
- Peck, M.D., 1994. Interaction of lipids with immune function I: Biochemical effects of dietary lipids on plasma membranes. *J. Nutr. Biochem.* 5, 466-477.

- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barraco, M.A.A., 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214, 19-33.
- Pérez-Farfante, I., 1988. Illustrated key to penaeoid shrimps of commerce in the Americas. NOAA Technical report NMFS 64, April 1988, 32p.
- Pérez-Farfante, I., Kensley, B., 1997. Peneid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Editions du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, Paris, Francia, 233p.
- Pérez-Jar, L., Rodríguez-Ramos, T., Ramos, L., Guerra-Borrego, Y., Racotta, I.S., 2006. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture* 252, 591-597.
- Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. *Aquaculture* 111, 51-63.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 253-258.
- Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 351-356.
- Racotta, I.S., Hernández-Herrera, R., 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A, 437-443.

- Racotta, I.S., Palacios, E., Méndez, L., 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Mar. Fresh. Behav. Physiol. 35, 269-275.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Hernández-Herrera, R., Carreño, D., 2003. Metabolic responses of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to environmental and handling stress. Comp. Biochem. Physiol. 134A, S27.
- Rees, J.F., Curé, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P., Menasveta, P., 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. Aquaculture 122, 193-207.
- Robertson, L., Bray, W.A., Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. J. World Aquacult. Soc. 18, 180-185.
- Rodríguez, J., Le Moullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191, 109-119.
- Roe, J.H., 1955. The determination of sugar in blood and spinal fluid with antrone reagent. J. Biol. Biochem. 212, 335-343.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., Van Wormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 268, 47-67.
- Rosas, C., Cooper, E.L., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., Miranda, G., Sánchez, A., 2004. Indicators of physiological and immunological status of

- Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). Mar. Biol. 145, 401-413.
- Ruiz-Verdugo, L.M., García-Bañuelos, M., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Yepiz-Plascencia, G.M., 1997. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Comp. Biochem. Physiol. 118B, 91-96.
- SAGARPA/CONAPESCA, 2006. Sitio en línea, fecha de acceso 12 de febrero 2006. <http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/prensa.htm>
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture 198, 13-28.
- Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 340, 184-193.
- Sargent, J.R., 1995. Origins and function of egg lipids: nutritional implications. En: Bromage, N.R., Robert, R.J. (ed.). Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science, Cambridge, UK, 353-372.
- Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., Moussignac, R.L., 2000. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. J. Exp. Med. 196, 1025-1037.

- Simopoulos, A.P., 2001. The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J. Nutr.* 131, 3065S-3073S.
- Singer, P., Richter-Heinrich, E., 1991. Stress and fatty liver-possible indications for dietary long-chain n-3 fatty acids. *Med. Hypotheses.* 36, 90-94.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 3-23.
- Sokal, R.R., Rohlf, J.F., 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, 3ra edición. W. H. Freeman and Company, New York, USA, 887p.
- Song, Y.L., Hsieh, Y.T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 201-209.
- Spivak, E.D., 1999. Effects of reduced salinity on juvenile growth of two co-occurring congeneric grapsid crabs. *Mar. Biol.* 134, 249-257.
- Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53-69.
- Stanley, D.W., Miller, J.S., 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119, 1-13.
- Staples, D.J., Heales, D.S., 1991. Temperature and salinity optima for growth and survival of juvenile banana prawns *Penaeus merguensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 154, 251-274.
- Sterling, P., 2004. Principles of allostasis: optimal design, predictive regulation, pathophysiology and rational therapeutics. En: Schulkin, J. (ed.). *Allostasis,*

- homeostasis, and the costs of physiological adaptation. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 17-64.
- Sterling, P., Eyer, J., 1988. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. En: Fisher, S., Reason, J. (ed.). Handbook of life stress, cognition and health. John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 629-649.
- Tseng, I.T., Chen, J.C., 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. Fish Shellfish Immunol. 17, 325-333.
- Tsing, A., Arcier, J.M., Brehélin, M., 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry, and hemograms. J. Invertebr. Pathol. 53, 64-77.
- van Ham, E.H., Hall, M.R., 1998. The effects of prophylactic formalin bath treatment on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. J. World Aquacult. Soc. 29, 357-364.
- Vargas-Albores, F., 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular responses. J. Mar. Biotechnol. 3, 153-156.
- Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture 191, 13-21.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A., Ochoa, J.L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol. 106A, 299-303.

- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Söderhäll, K., 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 299-306.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Yepiz-Plascencia, G.M., 1997. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B, 453-458.
- Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G., Magallón-Barajas, F., 1998. Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquacult. Research* 29, 549-553.
- Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Jiménez-Vega, F., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Yepiz-Plascencia, G., 1999. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Mendoza Alfaro, R. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del III Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 11 al 13 de Noviembre del 1996. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México, 433-439.
- Vargas-Albores, F., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., 2005. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. *Aquacult. Res.* 36, 352-360.
- Walker, A., Ando, S., Lee, R.F., 2003. Synthesis of a high-density lipoprotein in the developing blue crab (*Callinectes sapidus*). *Biol. Bull.* 204, 50-56.

- Warner, H.R., 1994. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.* 3, 249-258.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Wouters, R., Van Hauwaert, A., Naessens, E., Ramos, X., Pedrazzoli, A., Lavens, P., 1997. The effect of dietary n-3 HUFA and 22:6n-3/20:5n-3 ratio on white shrimp larvae and postlarvae. *Aquacult. Int.* 5, 113-126.
- Wouters, R., Gómez, L., Lavens, P., Calderón, J., 1999. Feeding enriched *Artemia* biomass to *Penaeus vannamei* broodstock: its effect on reproductive performance and larval quality. *J. Shellfish Res.* 18, 651-656.
- Xu, X., Ji, W., Castell, J.D., O'Dor, R., 1993. The nutritional value of dietary n-3 and n-6 fatty acids for the Chinese prawn (*Penaeus chinensis*). *Aquaculture* 118, 277-285.
- Xu, X.L., Ji, W.L., Castell, J.D., O'Dor, R.K., 1994a. Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquaculture* 119, 359-370.
- Xu, X.L., Ji, W.L., Castell, J.D., O'Dor, R.K., 1994b. Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. *Aquaculture* 127, 29-40.
- Yepiz-Plascencia, G., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, L., Ziegler, R., Higuera-Ciapara, I., 1995. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B, 181-187.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Jimenez-Vega, F., Ruiz-Verdugo, L.M., Romo-Figueroa, G., 1998. Shrimp plasma HDL and β -glucan binding protein (BGBP):

comparison of biochemical characteristics. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B, 309-314.

Yepiz-Plascencia, G., Gollas Galván, T., Vargas-Albores, F., García-Bañuelos, M., 2000. Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein β -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. *Mar. Biotechnol.* 2, 485-492.

ANEXOS

Anexo I. Procedimiento para la observación de hemocitos por microscopía óptica y toma de fotos.

Una muestra de hemolinfa fue obtenida a partir de los sacos ventrales del camarón blanco utilizando una jeringa que contenía un anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993) manteniendo una proporción hemolinfa-anticoagulante de 1:3. La muestra fue centrifugada a $800\text{ g} \times 5\text{ min}$ a 5°C . El sobrenadante fue desechado y el pelet de hemocitos que se precipitó fue fijado en una solución de Karnovsky durante 24 h (Karnovsky, 1965). Básicamente, esta solución se preparó a partir de un buffer de fosfato, glutaraldehído al 25%, y una solución de lavado conteniendo cloruro de sodio y glucosa entre otros. Posteriormente, se eliminó el fijador y se hicieron dos lavados de 30 minutos cada uno. La muestra fue deshidratada con alcohol al 30% durante varios días y se siguió la deshidratación con alcoholes al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100% haciendo baños durante 1 h para cada inclusión de alcohol. El pelet de hemocitos fue infiltrado en resina (JB-4 Plus® Embedding Kit, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizaron cortes en microtomo de rotación (Leica RM 2155, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania) a $0.5\text{ }\mu\text{m}$ de grosor con navaja de carburo de tungsteno. Los cortes realizados fueron montados en portaobjetos. Enseguida, se procedió a la tinción con hematoxilina-eosina. Para eso, la muestra fue hidratada en agua destilada durante 5 min, bañada en hematoxilina de Harris 1 min y enjuagada en agua destilada por 5 min. Después, la muestra fue deshidratada en alcohol etílico al 50% durante 2 min y se transfirió en alcohol al 70% durante 2 min. A continuación, la muestra fue

bañada en eosina alcohólica por 3 min y deshidratada con alcohol etílico al 96% haciendo dos baños de 3 min cada uno. Luego se baño la muestra dos veces en alcohol al 100% durante 1 min. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico (Olympus BX41, Tokyo, Japón) y las fotos fueron tomadas usando una cámara CoolSNAP-Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Las imágenes fueron analizadas con el programa Image-Pro Plus versión 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Anexo II. Procedimiento para la observación de hemocitos por microscopía electrónica y toma de fotos.

En un baño de agua destilada, se colocó un corte histológico montado en un portaobjeto durante 10 min para eliminar la resina. Enseguida, la muestra fue recubierta con paladio en una cámara de vacío (Denton Vacuum DESK II, Moorestown, NJ, USA; a 45 mA durante 35 s) y se observó en un microscopio electrónico de barrido (HITACHI S3000N, Tokio, Japón) a un voltaje de aceleración de 15 KV. La foto fue capturada con el programa Quartz PCI (Quartz Imaging Corporation, Vancouver, BC, Canadá).