CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

RESPUESTA METABÓLICA DEL CAMARÓN BLANCO, *Litopenaeus vannamei* EN RELACIÓN AL CICLO DE MUDA Y DURANTE EL PROCESO DE COSECHA EN UN CULTIVO SEMI-INTENSIVO ASÍ COMO SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD POSTCOSECHA

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación Acuicultura)

P r e s e n t a

Saúl Zamora Méndez

La Paz, Baja California Sur, Septiembre de 2017

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 15 del Mes de Agosto del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"RESPUESTA METABÓLICA DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*, EN RELACIÓN AL CICLO DE MUDA Y DURANTE EL PROCESO DE COSECHA EN UN CULTIVO SEMI-IMTENSIVO ASÍ COMO SU REPERCUSION SOBRE LA CALIDAD POSCOSECHA"

Presentada por el alumno:

Saúl Zamora Méndez

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

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

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Co-Director de Tesis

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Co-Director de Tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Co-Tutor

Dra. Ana Beltrán Lugo
Co-Tutor

Dr. Ángel Isidro Campa Cordova
Co-Tutor

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Co-Directores de tesis

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov, CIBNOR

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas, CIBNOR

Co-tutores

Dra. Elena Palacios Mechetnov, CIBNOR

Dra. Ana Beltrán Leiva, UABCS

Dr. Ángel Isidro Campa, CIBNOR

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Dra. Ana Beltrán Leiva

Dr. Ángel Isidro Campa

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Dra. Ana I. Beltrán Lugo

Dr. Ángel Isidro Campa

SUPLENTES

Dra. Stephanie Mercier Laurence

Dr. Alberto Peña Rodríguez

Resumen

Ciertos eventos asociados al ciclo de vida, como la muda como proceso natural que realizan continuamente los camarones para aumentar de tamaño y peso, y las condiciones de cultivo, como es el caso de la cosecha como proceso de manejo al final de un cultivo, representan situaciones de estrés para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. En el ciclo de muda, durante las etapas antes y después de la ecdisis, existe una compensación fisiológica que se relaciona con la pérdida de la exuvia y que podría considerarse como un estrés endógeno, dado que se trata de una repuesta adaptativa dirigida a mantener la homeostasis frente a ciertos estímulos como el desprendimiento del exosqueleto, el cambio osmótico, la falta de ingesta, entre otros. Así mismo algunas condiciones como persecución, confinamiento, hipoxia, cambios de temperatura, entre otros, pueden presentarse durante el proceso de cosecha favoreciendo una situación de estrés, que a su vez puede acelerar los cambios bioquímicos postmortem afectando potencialmente la calidad del producto para consumo humano.

El objetivo del presente estudio fue cuantificar y caracterizar la respuesta de estrés en términos de estatus energético celular ante un factor de estrés endógeno (muda) y exógeno (proceso de cosecha) así como su repercusión en la calidad postcosecha y así mejorar las prácticas de cultivo, estrategias de manejo y además contar con indicadores de susceptibilidad a estrés.

Primero se analizó el proceso fisiológico del ciclo de muda en *L. vannamei*, en donde se observó una disminución del 39.6% en el glucógeno del hepatopáncreas entre el estadio de premuda tardía (D4) y el de ecdisis, para recuperar su valor inicial en el estadio de postmuda temprana. La liberación correspondiente de glucosa y su completa oxidación en la cadena respiratoria mitocondrial es necesaria para sintetizar ATP para satisfacer el incremento en la demanda energética asociada al proceso de ecdisis. Así, en paralelo, se observó un incremento significativo en la producción de energía metabólica disponible (carga energética adenílica-CEA, fosfato de arginina-Arg-P y nucleótidos de guanílicos-GTP) en el músculo, durante la ecdisis y el estadio A, necesario en múltiples procesos fisiológicos asociados a la muda, incluyendo el rompimiento y liberación del exoesqueleto. En el presente trabajo también se observó una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en hepatopáncreas que en músculo. La mayor actividad se presentó durante la postmuda temprana, con un incremento en la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en hepatopáncreas, además de SOD y catalasa (CAT) en músculo. Durante la ecdisis se observó un incremento en la actividad de GPx en hepatopáncreas y CAT en músculo. También se observó un incremento en el daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante la determinación del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en hepatopáncreas durante la postmuda temprana.

En segundo lugar, se analizó el estado energético celular (antemortem) y los índices de frescura en el camarón *L. vannamei* en respuesta a prácticas de cosecha con uso de atarraya a borde de un estanque en un cultivo semi-intensivo antes de su almacenamiento en hielo durante seis días. Durante el almacenamiento de los camarones en hielo varios indicadores siguen el patrón post mortem típico, aunque la mayoría de ellos (hipoxantina, valor de pH y color) no alcanzaron niveles críticos en el día 6. El ATP y productos de degradación (AMP, IMP), así como varios indicadores de frescura (pH, agua expresable, dureza y color) no fueron significativamente afectadas por la emersión durante la cosecha. Sin embargo, se observó una menor elasticidad y una mayor cohesividad por efecto de la emersión antemortem, que puede deberse a cambios estructurales y de composición en proteínas y lípidos, así como una acumulación ligeramente mayor de hipoxantina y de peróxidos productos de la oxidación lipídica en la fase final del período de almacenamiento (6 días), lo que puede afectar la calidad de la carne en términos de percepción sensorial y calidad nutricional, particularmente a temperaturas ambientales más altas (por ejemplo, cosecha en verano) y para una duración de almacenamiento en hielo mayor a 6 días. Sin embargo, en la situación actual de la cosecha (mes de noviembre y almacenamiento en hielo durante 6 días), estos efectos son marginales y probablemente no afectan sustancialmente la calidad del producto para el consumo humano.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, ciclo de muda, estrés oxidativo, carga energética adenílica, emersión, cambios *pot mortem*.

Vo. Bo.

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Vo. Bo.

Dr. Francisco Javier Magallón B.

Summary

Some events associated with the life cycle of shrimp, such as molting, a natural process that shrimp continually perform to grow, and other events associated to its culture, such as harvest, represent stressful situations for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The stages before and after ecdysis of the molt cycle, present a physiological compensation associated to the loss of the exuviae that can be considered an endogenous stress as an adaptive response to maintain homeostasis faced with certain stimuli, such as the detachment of the exoskeleton, osmotic change, a reduced food intake, among others. Likewise, some conditions such as persecution, confinement, hypoxia, temperature changes among others, can occur during the harvesting process favoring a stress condition that in turn, can accelerate post-mortem biochemical changes affecting the quality of the product for human consumption.

The aim of the present study was to quantify and characterize the stress response in terms of cellular energy status, to endogenous (molt) and exogenous situations of stress factors (harvesting process), as well as its impact on post harvest quality. This information could contribute to improve culture practices, management strategies, and also as indicators of stress susceptibility.

First, the physiological process of the molt cycle in *L. vannamei* was analyzed, where a 39.6% decrease in hepatopancreas glycogen was observed between the late premolt (D4) and the ecdysis stages, then it recovered its initial value in the stage of early postmolt. The corresponding release of glucose and its complete oxidation in the mitochondrial respiratory chain is necessary to synthesize ATP to satisfy the increase in energy demand associated with the ecdysis process. Indeed, a significant increase in the production of available metabolic energy (adenylic energy charge-AEC, arginine phosphate-Arg-P, and guanylic-GTP) was observed in muscle during ecdysis and stage A, which is necessary in multiple physiological processes associated to the molt, including the rupture and release of the exoskeleton. In the present work, a higher activity of the antioxidant enzymes in hepatopancreas compared to muscle was also observed. The highest value of enzymatic activity was observed in early postmolt with an increase in SOD and GPx activity in hepatopancreas in addition to SOD and CAT in muscle. During ecdysis, an increase in the activity of GPx in hepatopancreas and CAT in muscle was observed. Also, an increase in ERO-induced damage was also found in hepatopancreas during early postmolt, inferred from the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Second, cellular energy status (antemortem) and freshness indexes in shrimp *L. vannamei* were analyzed in response to harvest practices using a cast-netting at the edge of the pond in a semi-intensive culture before storage in ice for six days. During storage of shrimp on ice, several indicators followed the typical postmortem pattern, although most of them (hypoxanthine, pH value and color) did not reach critical levels on day 6. The ATP and degradation products (AMP, IMP) as well as several indicators of freshness (pH,

expressible water, hardness and color) were not significantly affected by emersion during harvest. However, lower elasticity and greater cohesiveness were observed as a result of antemortem stress, which may be due to changes in structure and composition of proteins and lipids. A slightly higher accumulation of hypoxanthine and lipid peroxidation products observed at the final phase of the storage period (6 days) may affect the quality of the meat in terms of sensory perception and nutritional quality, particularly at higher ambient temperatures (e.g. harvest in the summer) and for a shelf life in ice greater than 6 days. However, in the current harvest situation (November and 6-day storage on ice), these effects are marginal and probably do not substantially affect the quality of the product for human consumption.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, molt cycle, oxidative stress, energy charge, emersion, change *post mortem*.

Vo. Bo.

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Vo. Bo.

Dr. Francisco Javier Magallón B.

Dedicatoria

A mi familia

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, por brindar el espacio y facilidades para el desarrollo del trabajo de tesis. Al CONACYT por la beca otorgada con número de registro 2021320067; Al proyecto SEP-CONACYT (No. 101733) "Evaluación del estatus energético del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, a través de distintos enfoques experimentales en tres condiciones fisiológicas: muda, reproducción y estrés"; Al Proyecto PROINNOVA SEP-2010-156118, tanto por el financiamiento para el desarrollo del trabajo como por la beca terminal de Doctorado otorgada. A los Drs. Ilie Racotta y Francisco Magallón por dirigir este trabajo, así como al comité tutorial Dra. Elena Palacios, Dra. Ana Beltrán Leiva y Dr. Ángel isidro Campa por sus sugerencias, correcciones y apoyo.

Agradezco el apoyo técnico del siguiente personal del CIBNOR:

- Olivia Arjona López por su apoyo para realizar el trabajo experimental en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos.
- Roberto Hernández Herrera por el apoyo técnico para la realización de análisis en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica.
- Orlando Lugo Lugo por el apoyo brindado para los análisis de estrés oxidativo en el Laboratorio de Salud Ambiental y Biomedicina.
- Baudilio Acosta Vargas y Griselda Peña Armenta del Laboratorio de Espectrofotometría de Absorción Atómica por el apoyo de agua desionizada para los análisis de HPLC.
- Carlos Ernesto Ceseña por el apoyo brindado para la realización de los bioensayos en el Laboratorio de Maduración y Reproducción de Crustáceos.
- Rosa Linda Salgado García por el apoyo en el Laboratorio de Metabolismo Energético.
- María del Carmen Rodríguez Jaramillo y María Eulalia Meza Chávez por su apoyo en el Laboratorio de Histología e Histoquímica.

Un especial agradecimiento a Arlett Robles Romo por su valioso apoyo durante la realización de este trabajo.

Al personal de la biblioteca por las facilidades otorgadas, Ana María Talamantes Cota, Susana García Luna y por hacer accesibles muchos artículos a María Esther Ojeda Castro. A Horacio Sandoval Gómez por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Cómputo de Posgrado.

A todos los compañeros del Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, quienes brindaron apoyo para la realización de parte del trabajo experimental.

Contenido

Resumen i

Summary iii

Dedicatoria v

Agradecimientos vi

Lista de figuras xii

Lista de tablas xiv

1. INTRODUCCIÓN 1

2. ANTECEDENTES 3

2.1 Concepto de estrés y sus consecuencias 3

2.2 Ciclo de muda 10

2.2.1 Estrés oxidativo y defensas antioxidantes 13

2.2.2 Peroxidación lipídica 16

2.3 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *L. vannamei* en respuesta al estrés de cosecha 18

2.3.1 Consecuencia de la cosecha como agente estresante 18

2.3.2 Cambios autolíticos 22

2.3.2.1 Degradación de nucleótidos 23

2.3.2.2 Proceso de proteólisis 24

2.3.2.3 Proceso de lipolisis y peroxidación lipídica post mortem 25

2.3.3 Métodos para la evaluación de la calidad alimentaria en productos marinos 26

2.3.3.1 Calidad de un alimento 26

2.3.3.2 Métodos químicos 27

2.3.3.3 Métodos físicos 27

2.3.3.4 Determinación del pH muscular 27

2.3.3.5 Análisis del perfil de textura 27

2.3.3.6 Colorimetría 29

3. JUSTIFICACIÓN 32

4. HIPÓTESIS 33

5. OBJETIVO GENERAL 33

5.1 Objetivos particulares 33

6. MATERIALES Y MÉTODOS 34

6.1 Diseño experimental 34

6.1.1 Metabolismo energético y actividad enzimática antioxidante durante el ciclo de muda de *Litopenaeus vannamei* 34

6.1.2 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *Litopenaeus vannamei* en respuesta al estrés de cosecha 36

6.2 Métodos analíticos 37

6.2.1 Extracción, procesamiento y cuantificación de nucleótidos y fosfágenos 37

6.2.2 Condiciones de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la cuantificación de nucleótidos (ATP, ADP, AMP, IMP, Hx, GTP y GDP) 38

6.2.3 Condiciones del HPLC para la cuantificación fosfato de arginina 39

6.2.4 Reservas, combustibles y metabolitos 40

6.2.4.1 Proteínas totales 40

6.2.4.2 Lactato 40

6.2.4.3 Triglicéridos 41

6.2.4.4 Lípidos totales 41

6.2.4.5 Glucógeno 41

6.2.4.6 Colesterol 41

6.2.5 Histología 42

6.2.6 Indicadores de estrés oxidativo y actividad de enzimas antioxidantes 42

6.2.6.1 Superóxido dismutasa 43

6.2.6.2 Catalasa 43

6.2.6.3 Glutatión peroxidasa 43

6.2.6.4 El valor de Peróxido (LOOH) 44

6.2.6.5 Peroxidación de lípidos (TBARS) 44

6.2.7 Análisis fisicoquímicos 45

6.2.7.1 Valoración del pH 45

6.2.7.2 Medición del color 45

6.2.7.3 Análisis de perfil de textura (APT) 45

6.2.7.4 Agua expresable (AE) 46

6.3 Análisis estadístico 46

7. RESULTADOS 47

7.1 Resultados del metabolismo energético y actividad enzimática antioxidante durante el ciclo de muda de *Litopenaeus vannamei* 47

7.1.1 Actividad enzimática antioxidante 51

7.1.2 Histología 52

7.2 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *Litopenaeus vannamei* en respuesta al estrés de cosecha 62

7.2.1 Contenido de nucleótidos 62

7.2.2 Análisis bioquímicos en músculo de camarón 67

7.2.3 Valoración de pH 68

7.2.4 Color 70

7.2.4.1 Parte externa 70

7.2.4.2 Parte interna 73

7.2.5 Análisis de perfil de textura (APT) y agua expresable 76

La cohesividad (Fig. 24c) y la elasticidad (Fig. 24d) sólo se vieron afectadas por el estrés *ante mortem*, pero no por el almacenamiento en hielo, con valores significativamente más bajos en camarones estresados en un 21% para elasticidad y en un 4% mayores para cohesividad..... 77

7.2.6 Peroxidación lipídica 77

8. DISCUSIÓN 78

8.1 Análisis Bioquímicos durante el ciclo de muda 78

8.1.1 Metabolismo energético en los diferentes estadios del ciclo de muda 80

8.1.2 Actividad enzimática en los diferentes estadios del ciclo de muda 84

8.2 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *L. vannamei* en respuesta al estrés de cosecha 87

8.2.1 Efecto inmediato de la emersión y confinamiento en camarones capturados con atarraya a borde de un estanque 87

8.2.2 Efecto de las prácticas comunes de cosecha *ante mortem* sobre la calidad *post mortem* de *L. vannamei* a largo plazo 90

8.2.3 pH 91

8.2.4 Color 92

8.2.5 Agua expresable 93

8.2.6 Análisis del perfil de textura (APT) 94

8.2.7 Hidroperóxidos (LOOH) 96

9. CONCLUSIONES 97

10. LITERATURA CITADA 99

11. ANEXOS 119

Anexo I. Curvas de calibración nde nucleótidos. 119

Anexo II. Curva de calibración fosfato de arginina. 120

Anexo III. Artículos derivados de la tesis. 121

Lista de figuras

Figura 1. Cambios morfológicos en los urópodos durante el ciclo de muda de *L. vannamei* ……. 11
Figura 2. Balance de antioxidantes y especies reactivas *in vivo*…… 14
Figura 3. Las defensas antioxidantes enzimáticas trabajan en conjunto para proteger las células contra las especies reactivas del oxígeno. ……. 15
Figura 4. Esquema simplificado de las principales reacciones involucradas en el proceso de peroxidación lipídica…….. 17
Figura 5. Degradación post mortem del adenosin trifosfato (ATP) en peces y crustáceos…… 24
Figura 6. Espacio de color CIE L*a*b*…… 31
Figura 7. Concentraciones de (a) ATP (adenosín trifosfato), (b) ADP (adenosín difosfato), (c) AMP (adenosín monofosfato), (d) y NAT (nucleótidos adenílicos totales), así como valores calculados de (e) CEA (carga energética adenílica), y (f) relación ATP/ADP en el músculo abdominal de *L. vannamei* durante los diferentes estadios del ciclo de muda…….. 49
Figura 8. Cambios en las concentraciones de (a) IMP (Inosina monofosfato), (b) Hx (Hipoxantina), (c) GTP (Guanosín trifosfato), (d) GDP y (Guanosín difosfato) (e) ArgP (fosfato de arginina) en el músculo abdominal de L. vannamei durante los diferentes estadios del ciclo de muda…… 50
Figura 9. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio C del ciclo de muda…… 53
Figura 10. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D0 del ciclo de muda…….. 54
Figura 11. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D1 del ciclo de muda…… 55
Figura 12. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D2 del ciclo de muda…… 56
Figura 13. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D3 del ciclo de muda…… 57
Figura 14. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D4 del ciclo de muda…… 58
Figura 15. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio E del ciclo de muda…… 59
Figura 16. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio A del ciclo de muda…… 60
Figura 17. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio B del ciclo de muda. …… 61
Figura 18. Cambios en las concentraciones de (a) ATP (adenosín trifosfato), (b) ADP (adenosín difosfato) y (c) AMP (adenosín monofosfato), en el músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente…… 64
Figura 19. Cambios en las concentraciones de (a) NAT (Nucleótidos adenílicos totales) y (b) CEA (Carga energética adenílica), en el músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente…… 66
Figura 20. Cambios en las concentraciones de (a) IMP (inosín monofosfato) y (b) Hx (Hipoxantina), en el músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente …… 67
Figura 21. Cambio en la concentración de pH, en el músculo abdominal de *L. vannamei*

capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente……. 68
Figura 22. Cambios en las variables de color: (a) L*(luminosidad), (b) a*(matiz rojo-verde), (c) b* (matiz amarilo-azul), (d) Cromaticidad, (e) Ángulo de matiz y (f) Índice de blancura, en la parte exterior del músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente…… 71
Figura 23. Cambios en las variables de color: (a) L* (luminosidad), (b) a* (matiz rojo-verde), (c) b* (matiz amarilo-azul), (d) Cromaticidad, (e) Ángulo de matiz y (f) Índice de blancura, en la parte interior del músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente…… 74
Figura 24. Cambios en las variables del análisis del perfil de textura en músculo de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente... 76
Figura 25. Cambios en las concentraciones de LOOH en músculo de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente ……. 77

Lista de tablas

Tabla I. Consumo de oxígeno en los estadios de premuda-ecdisis, en algunos crustáceos…. 12
Tabla II. Valores de CEA y ArgP (µmol/g) en crustáceos en diferentes etapas del ciclo de muda…… 13
Tabla III. Fosfato de arginina, nucleótidos y sus productos de degradación por efecto de la captura en diferentes crustáceos…… 21
Tabla IV. Definiciones de los parámetros mecánicos de la textura…….…… 29
Tabla V. Variables bioquímicas determinadas en músculo de *L. vanammei* durante el ciclo de muda. ……. 47
Tabla VI. Variables bioquímicas determinadas en hepatopáncreas de *L. vanammei* durante el ciclo de muda…….…… 47
Tabla VII. Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés), superoxido dismutasa (SOD), Glutation peróxido (GPx) y catalasa (CAT) en tres estadios seleccionados del ciclo de muda de *L. vannamei*…….. 51
Tabla VIII. Niveles de arginin fosfato, carga energética adenílica, nucleótidos adenílicos individuales y sus subproductos metabólicos en camarones capturados en estanques con atarraya e inmediatamente ……. 62
Tabla IX. Variables metabólicas cuantificadas en músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannemei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente…… 69

Lista de abreviaturas

a*	Matiz rojo-verde
ADP	Adenosín difosfato
AE	Agua expresable
AMP	Adenosín monofosfato
APT	Análisis del perfil de textura
ArgP	Fosfato de arginina
ATP	Adenosín trifosfato
b*	Matíz amarillo-azul
BVT	Bases volátiles totales
C*	Cromaticidad
CAT	Catalasa
CEA	Carga energética adenílica
COL	Colesterol
ETA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GCG	Glucógeno
GDP	Guanosín difosfato
GPx	Glutatión peroxidasa
GR	Glutatión disulfuro reductasa
GSH	Glutatión
GSSG	Glutatión disulfuro
GST	Glutatión-S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
H°	Ángulo de matíz
HO•	Radical oxhidrilo
H_2O_2	Peróxido de hidrogeno
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia o
HUFA	Ácidos grasos altamente insaturados
Hx	Hipoxantina
IMP	Inosina monofosfato
INO	Inosina
L*	Luminosidad
L•	Radical libre
LOO•	Radical peroxilo lipidico
LAC	Lactato
LOOH	Valor de peróxido
LT	Lípidos totales
NAT	Nucleótidos adenílicos totales
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH	Nicontinamin adenín dinucleótido fosforilado reducido
O_2	Oxígeno molecular
O_2•-	Radical superóxido
pH	Potencial Hidrógeno
PT	Proteínas totales
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
SOD	Superóxido dismutasa
TG	Triglicéridos
TRABS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
U mg^{-1}	Unidades por miligramo
µL	Microlitros
ups	Unidades porcentuales de salinidad

1. INTRODUCCIÓN

El volumen anual producido de crustáceos por acuicultura en el mundo, fue de 6.9 millones de toneladas en 2014, con un valor de 36.2 millones de dólares (FAO, 2016), de los cuales 3.7 millones de toneladas fueron constituidas por el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (FAO fishstat). Para lograr alcanzar los volúmenes de producción requeridos, la tendencia mundial en la industria acuícola está dirigida hacia la intensificación, incrementándose de esta manera la productividad y los márgenes de ganancia económica (Piedrahita, 2003; Bosma y Verdegem, 2011; Gyalog *et al*., 2011; Aguilar *et al*., 2012). Además, la acuicultura de crustáceos tiene un reto progresivo en la seguridad alimentaria mundial, en términos de volumen y calidad de los alimentos. Adicionalmente, la acuicultura tiene el reto de proveer productos acuáticos de manera sustentable y amigable con el ambiente, garantizando que sean de alta calidad nutricional, inocuos y bioseguros (FAO, 2016). Incrementar el volumen de producción sin afectar la calidad o el ambiente, implica optimizar el desempeño de camarones en cultivo por medio de un mejor conocimiento de procesos fisiológicos como alimentación, ingestión/digestión, osmorregulación/excreción y respiración/circulación, particularmente relacionados con el rendimiento, como es el caso de la defensa inmune, la reproducción y la respuesta de estrés. Las condiciones de cultivo intensivas, aunque se mantienen controladas o semicontroladas, presentan estresores comunes tales como la densidad de organismos, la manipulación o manejo físico de los organismos, los cambios ambientales, la nutrición, y la presencia de patógenos. Asimismo existen procesos endógenos, como el proceso de muda, que pueden considerarse como situaciones de estrés para el organismo. Varios de estos procesos son inherentes al proceso de cultivo o al ciclo biológico mismo como es el caso de la cosecha como proceso de manejo al final de un cultivo, o el ciclo de muda como proceso natural que realizan continuamente los camarones para aumentar de tamaño y peso.

El estrés representa una respuesta del organismo en la cual su equilibrio dinámico, denominado “homeostasis”, es afectado o alterado como resultado de estímulos intrínsecos o extrínsecos, comúnmente denominados “agentes estresantes o estresores” (Chrousos *et al*., 1992). La respuesta de estrés es mediada por el sistema neuroendócrino que desencadena a su vez una serie de cambios metabólicos para mantener las funciones vitales ante los agentes estresores. El estrés implica una disminución en el adenosín trifosfato (ATP) celular que tiene que compensarse por un aumento en la producción del mismo para poder mantener el balance energético celular inferido por la carga energética adenílica (CEA) (Atkinson y Walton, 1967; Moal *et al*., 1989; Wang *et al*., 2002; Morris *et al*., 2005). Además del ATP, el fosfato de arginina (ArgP, por sus siglas en inglés) constituyen un reservorio importante de energía en el músculo de invertebrados (Ellington, 2001), cuya principal función es la de suplementar al ATP de manera rápida en situaciones de una alta demanda energética. Por lo anterior, se ha vuelto necesario estudiar de manera cuantitativa el efecto de estas respuestas en los organismos a algún estimulo(s) determinado(s), con el fin de mejorar las prácticas de cultivo, las estrategias de manejo y además contar con indicadores de susceptibilidad a estrés.

Con base en esto es importante señalar que la captura (cosecha) como etapa final dentro de la acuicultura, puede representar una condición de estrés para el organismo, por lo cual los niveles de algunas de las variables que forman parte de la respuesta de estrés reflejan precisamente esta condición inducida por la misma captura y las condiciones (persecución, confinamiento, hipoxia, temperatura entre otros factores) en las que se podrían encontrar a lo largo de este proceso. Las consecuencias de no manejar el estrés generado por la cosecha, puede tener repercusiones en la bioquímica *post mortem* del músculo, las características de calidad y finalmente el valor del producto que se ve alterado (Poli *et al.*, 2005; Wilkinson *et al*., 2008; Gornik *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2017).

Por otro lado el ciclo de muda es un proceso endógeno y cíclico el cual se caracteriza por una serie cambios fisiológicos y bioquímicos (controlados hormonalmente) que realizan los camarones para aumentar de tamaño y peso (Chan *et al*., 1988; Chang, 1995; Sánchez-Paz *et al*., 2007; Bonilla-Gómez *et al.*, 2012). El ciclo de muda se divide en etapas que se pueden resumir en postmuda, intermuda, premuda y ecdisis, las cuales a su vez, se pueden subdividir en varios estadios. En el proceso de muda algunos estadios (premuda y postmuda) se pueden considerar como un estrés endógeno el que por ende, también puede influir en la bioquímica *post mortem*. Por lo tanto el proceso de cosecha aunado a organismos en estadios críticos del ciclo de muda puede provocar un efecto sinérgico en relación a las respuestas de estrés.

2. ANTECEDENTES

2.1 Concepto de estrés y sus consecuencias

Son pocos los conceptos biológicos que han suscitado tantas controversias como lo es el de estrés; como resultado, existen numerosas definiciones en los trabajos científicos (Pickering, 1981). Sin embargo se asume que el estrés ocurre al existir un estímulo de ciertas características que interactúa sobre los sistemas biológicos provocando una respuesta. El estímulo se puede clasificar de acuerdo a su duración: cuando éste se presenta de forma prolongada, ya sea de manera repetitiva o continúa (días, semanas), se considera que se produce estrés crónico. Por el contrario, cuando el estímulo solo se presenta por un corto tiempo de manera puntual (minutos, horas) se considera que se produce un estrés agudo (Aguilar-Medina, 2009). En la práctica acuícola, la respuesta aguda es causada principalmente por captura, manejo, biometrías, transporte, y cambios abruptos en los factores ambientales (p. ej. oxígeno disuelto y temperatura); los efectos incluyen sólo parte del ciclo vital del organismo. El estrés crónico es causado por agentes persistentes y de larga duración, como las densidades altas de cultivo, la variación en la

calidad del agua, la exposición a nuevos ambientes y la dominancia social; los efectos que se producen a largo plazo incluyen el ciclo de vida completo del organismo (Pickering, 1981; Wedemeyer y McLeay, 1981; Laidley y Leatherland, 1988; Auro y Ocampo, 1999).

Si bien la intensidad del estrés depende del organismo y no puede ser medida, las respuestas al estímulo sí se determinan cuantitativamente (Flores, 2002). Dependiendo de la intensidad del agente estresante, la respuesta de estrés puede presentar dos niveles: a) el de una respuesta de estrés con fines compensatorios y/o adaptativos, que le permite al organismo recuperar su estado de homeostasis; por lo general causado por agentes estresantes de impacto mínimo a moderado y, b) el que resulta en la inhibición del crecimiento, afectación en la reproducción y de la capacidad de respuesta inmune con una menor resistencia al ataque de patógenos, nivel causado por agentes estresantes agudos o crónicos severos que producen una respuesta de estrés que pierde su valor adaptativo y se vuelve disfuncional (Wendelaar-Bonga, 1997). Por lo tanto, el estrés y sus implicaciones se deben considerar como una serie de respuestas adaptativas destinadas a re-direccionar aspectos metabólicos y elementos celulares para hacer frente a una situación desfavorable.

Aunque la respuesta de los organismos frente a los agentes estresores es muy variable; en vertebrados se tiene bien establecido que la respuesta de estrés está regida tanto por el eje hipotálamo-simpático-médula suprarrenal, interrenal o cromafín, como por el eje hipotálamo-hipofisiario-corteza suprarrenal (Chrousos y Gold, 1992). Sin embargo, la respuesta de estrés en invertebrados es menos comprendida que para vertebrados, y aún si existen respuestas que son análogas a la respuesta en peces, los mecanismos neuroendocrinos (respuesta primaria al estrés) son totalmente diferentes (Aparicio-Simón, 2009).

El primer órgano neurohemal identificado en crustáceos fue la glándula de seno (GS), que se ubica en la base del pedúnculo ocular y está próxima al seno hemolinfático donde libera sus productos. Los axones terminales que constituyen la GS se originan de los

cuerpos celulares de las neuronas localizadas en el órgano X (OX), el cual se ubica en la médula terminalis del pedúnculo ocular. Dado que los productos secretados por la GS se sintetizan en los somas de las neuronas del OX, este complejo se conoce como órgano X glándula del seno (OX-GS). La importancia del complejo OX-GS se debe al gran número de neuropéptidos que sintetiza y a la importancia de las funciones en las que estos neuropéptidos intervienen (García y Aréchiga, 1998). Otras estructuras no neuronales con función endócrina compuestas por grupos de células epiteliales modificadas que sintetizan hormonas y las liberan hacia los senos hemolinfáticos adyacentes se incluyen el órgano Y, la glándula androgénica, los ovarios, el órgano mandibular y los efectores pigmentarios (Fingerman, 1997).

En crustáceos el complejo OX-GS desempeña un papel central en las respuestas fisiológicas y la regulación de las actividades biológicas, ya que entre las principales hormonas secretadas por la glándula sinusal se encuentran: MIH (hormona inhibidora de muda), GIH (hormona inhibidora de la gónada), MOIH (hormona inhibidora del órgano mandibular), CHH (hormona hiperglucémica de crustáceos) y NDH (hormona neurodepresora. Algunas de estas hormonas (MIH, GIH, MOIH) tienen una glándula endocrina como segundo órgano blanco, mientras que otros tienen tejidos somáticos como órganos blancos (Lorenzon, 2005; Fanjul-Moles, 2006).

Respuesta primaria

Se ha sugerido que la respuesta de estrés es mediada por la CHH, que figura como el mecanismo neuroendocrino más conocido en crustáceos ya que se tiene observado un incremento de la CHH relativamente rápido, seguida de hiperglucemia tras la exposición a agentes estresantes. La función principal de CHH es la regulación de los niveles de glucosa en hemolinfa (Chang *et al*., 1998; Santos *et al*., 2001; Lorenzon, 2005; Chung y Webster, 2003; Fanjul-Moles, 2006; Chung y Zmora, 2008). Durante su transporte a través de la hemolinfa, la CHH se une a una hemocianina e induce la movilización de glucosa de las reservas de glucógeno de los diferentes tejidos, en particular del músculo e intestino

medio, estimulando la glucogenólisis, la inhibición de la glucógeno sintetasa y la activación de glucógeno-fosforilasa. Adicionalmente se ha observado que el lactato que resulta del flujo glicolítico puede estimular la liberación de CHH y por lo tanto la glucogenólisis (Sedlmeier, 1988; Fanjul-Moles, 2006).

Respuesta secundaria

La respuesta secundaria de estrés en crustáceos, al igual que en vertebrados, consiste en cambios metabólicos que tienen la finalidad de producir la energía necesaria para restablecer la condición de equilibrio, perturbada por la exposición a agentes estresores. En relación a esto se han realizado numerosos trabajos donde se proponen diversos indicadores metabólicos de la respuesta secundaria de estrés. Dentro de los indicadores clásicos de estrés existe cierta información a nivel de respuestas metabólicas de estrés ambiental o por manipulación.

Uno de los principales indicadores de estrés son los niveles de glucosa, ya que es el principal monosacárido presente en la hemolinfa de crustáceos y sirve a siete objetivos principales: síntesis de mucopolisacáridos, síntesis de quitina, síntesis de ribosa y fosfato dinucelotido adenina nicotinamida reducido (NADPH), síntesis de glucógeno y fuente de energía, como ya se había mencionado, tanto por vía aerobia como anaerobia (Chang y O´Connor, 1983; Jimenez y Kinsey, 2015). Por lo anterior, los niveles estables de glucosa en la hemolinfa son esenciales para un adecuado funcionamiento de los organismos. Se ha reportado que en una situación de mayor demanda de energía, los niveles de glucosa se incrementan como parte de la respuesta de estrés por manipulación (Racotta y Palacios, 1998; Mercier *et al*., 2009; Aparicio-Simón *et al*., 2010; Robles *et al*., 2016) así como por cambios ambientales que pueden ser inducidos experimentalmente (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Racotta *et al*., 2002; Mugnier *et al*., 2008).

En *L. vannamei* se han reportado valores considerados como basales de entre 10-20 mg dL^{-1} (Aguilar-Medina, 2009; Aparicio-Simón, 2009; Pascual *et al*., 2003); después de

un agente estresante estos valores pueden incrementarse hasta 50 mg dL^{-1} (Aguilar-Medina, 2009; Aparicio-Simón, 2009). Asimismo, se ha observado que la simple captura con atarraya en estanques litorales induce una repuesta de estrés en términos de una notable hiperglucemia, en la cual se alcanzan valores hasta de 60 mg dL^{-1} (Aparicio-Simón, 2009). Sin embargo, los niveles de glucosa también pueden reflejar el estado nutricional (Pascual *et al*., 2003). En este sentido, las concentraciones más bajas de glucosa en hemolinfa, se observan en condiciones de laboratorio que van de 10 a 15 mg dL^{-1} (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Racotta *et al*., 2002; Mercier *et al*., 2006; Robles *et al*., 2016), en donde el aporte de alimento natural es nulo y la toma de muestras de los organismos se realiza en estrictas condiciones de ayuno.

A nivel de tejidos, la glucosa se metaboliza por vía anaerobia hasta lactato lo cual es una respuesta común en muchas situaciones de estrés en *L. vannamei* (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández, 2000; Pérez-Rostro, 2004; Mercier *et al*., 2006; Aparicio-Simón *et al*., 2010; Robles *et al*., 2016; Zamora-Méndez, 2012). La activación del metabolismo anaerobio es particularmente importante en condiciones de hipoxia ambiental (Racotta *et al*., 2002; Mugnier *et al*., 2008) o funcional (Racotta y Palacios, 1998; Aparicio-Simón *et al*., 2010; Robles *et al*., 2016) que se da por actividad muscular intensa como lo es la respuesta de escape en *L. vannamei*. Así, la respuesta de estrés en términos de incremento de lactato en hemolinfa es característico de *L. vannamei* bajo condiciones de mínimo estrés, durante el muestreo los niveles basales pueden ser tan bajos como 5 mg dL^{-1} o incluso menores tanto en condiciones de laboratorio como en tanques al exterior (Mercier *et al*., 2009; Aparicio-Simón *et al*., 2010; Robles *et al*., 2016), mientras que se pueden alcanzar niveles cercanos a los 20 mg dL^{-1} en la mismas condiciones en camarones sujetos a estrés por manipulación. Sin embargo, los niveles obtenidos como respuesta de estrés por captura con atarraya son mucho mayores, obteniéndose niveles de hasta 150 mg dL^{-1} en estanques supralitorales (Aparicio-Simón, 2009) y de 260 mg dL^{-1} en estanques de mareas (Racotta, datos no publicados).

Otros indicadores de estrés pueden ser los niveles de reservas bioquímicas, como lo es el glucógeno, el cual puede ser almacenado en hepatopáncreas, músculos y branquias (Buckup *et al*., 2008). El glucógeno puede ser utilizado en la muda, durante adaptaciones a cambios ambientales como hipoxia o anoxia y osmorregulación, durante el crecimiento, en las diferentes etapas de reproducción y durante periodos de ayuno (Oliveira *et al*., 2003; Buckup *et al*., 2008).

En cuanto a las proteínas, el músculo es el principal almacén en crustáceos (Buckup *et al*., 2008) y se ha documentado una disminución en los niveles de proteínas en hemolinfa en *Penaeus monodon* expuestos a baja salinidad y altos niveles de amonio (Chen y Cheng, 1994) y en condiciones similares de salinidad y amonio para *Penaeus japonicus* (Chen *et al*., 1994). Sánchez *et al*. (2001) reportaron variaciones en los niveles de proteína en hemolinfa de adultos de *Litopenaeus setiferus* en poblaciones silvestres durante la aclimatación partiendo de 24°C a 27°C y 30°C. Pascual *et al*. (2003) observaron en *L. vannamei* que las condiciones de laboratorio produce valores más bajos en proteínas que los observados en camarones recién capturados.

Además de las respuestas ya mencionadas, existen otro tipo de indicadores de estrés. Este tipo de indicadores se basan en el estudio de procesos bioenergéticos en los organismos, los cuales permiten entender de qué manera se obtiene, se almacena, se transfiere y se utiliza la energía para mantener las funciones vitales de los organismos y como se ajustan estos procesos en etapas o situaciones particulares de demanda energética, como lo es el estrés. Existen diferentes enfoques experimentales para el estudio de la bioenergética que van desde el nivel molecular hasta el nivel de organismo. Estos enfoques se basan de manera general en el papel central del ATP como intermediario energético celular, en el oxígeno como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa donde se genera el ATP y en los combustibles y reservas que a través de su catabolismo oxidativo producen los intermediarios reducidos (NADH) donadores de protones para la síntesis de ATP (Schäfer y Penefsky, 2008). Un indicador

directo de la energía celular disponible para realizar el trabajo biológico se basa en los niveles relativos de adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP) y adenosín monofosfato (AMP), comúnmente representados como carga energética adenílica (CEA) = (ATP + 1/2ADP)/ (ATP + ADP + AMP) (Atkinson y Walton, 1967). Como ya se mencionó, el estrés implica también un incremento en el consumo de ATP y por lo tanto, un desbalance energético celular inferido por la CEA. Como el trabajo es continuo pero el aporte de energía no lo es, el ATP se produce cuando se necesita. Según Atkinson (1968), en estado estable las células, tejidos, órganos y organismos deben de mantener un equilibrio entre la síntesis y la degradación de ATP. El ATP es el principal donador inmediato de energía en los sistemas biológicos. En una célula típica, la molécula de ATP se consume dentro del primer minuto que sigue a su formación, por lo que el movimiento, el transporte activo, la amplificación de señales y los procesos de biosíntesis pueden ocurrir sólo si el ATP se regenera continuamente (Stryer, 1998 en Galindo y Flores, 2006). Atkinson (1968) menciona que cuando se tiene una contribución adecuada de sustrato energético y existe una tendencia de la CEA a disminuir se producirá una compensación que consistirá en una mayor síntesis de ATP, así el estado metabólico permanecería estable gracias a la regulación. En el caso contrario en que no se cuente con el aporte adecuado de ATP, resultará en una disminución de la CEA y el reordenamiento de los procesos que generan y utilizan ATP, con esto se mantendrá en estado estable la nueva condición metabólica con un menor valor de la CEA.

Además del ATP, el ArgP constituye un reservorio importante de energía en el músculo de invertebrados (Ellington, 2001). Existen varios estudios que analizan la CEA o los niveles de ArgP como indicadores del estado energético y fisiológico general de crustáceos en condiciones que ocurren de manera común durante el cultivo. En el camarón *Palemon serratus*, la exposición a altas concentraciones de amonio disminuye la CEA, por lo que se ha propuesto como un indicador del límite de la capacidad de respuesta de un organismo ante un estrés ambiental (Marazza *et al*., 1996). En el camarón *Penaeus chinensis*, se han obtenido los valores más altos de CEA en el pH óptimo, mientras que los valores

disminuyen paralelamente a la supervivencia a pH ácidos o alcalinos (Wang *et al*., 2002). La relación entre la CEA y temperatura en el langostino *Macrobrachium nipponense* es bastante compleja y en este caso, no hay una relación clara con valores más altos de CEA y temperatura óptima de crecimiento (Wang *et al*., 2006). En cuanto a los niveles de ArgP, estos se alteran por el efecto combinado de la hipoxia y de la exposición al plomo en *Cherax destructor* (Morris *et al*., 2005). Morris y Adamczewska (2002) han documentado que después de un evento donde acontecen contracciones del músculo abdominal, la restauración de los fosfatos de alta energía y las reservas de oxígeno generalmente se llevan a cabo en menos tiempo que la remoción del lactato.

2.2 Ciclo de muda

El crecimiento de los crustáceos decápodos está condicionado por el exoesqueleto que debe ser mudado periódicamente para aumentar de tamaño y peso (Chang, 1989; Cesar *et al*., 2006; Hou *et al*., 2011). El proceso de muda se repite varias veces a lo largo de la vida de los organismos y el intervalo entre dos mudas sucesivas puede ser dividido en cuatro etapas cada una con sus diferentes estadios: postmuda o metaecdysis (estadio A y B), intermuda o anecdysis (estadio C), premuda o proecdysis (estadio D) y ecdisis (estadio E) que es la culminación o desprendimiento del exoesqueleto (Fig. 1) (Chang y Mykles, 2011).

El evento crítico de la ecdisis representa un gasto energético porque el organismo realiza una serie de flexiones del músculo abdominal para poder desprenderse del exoesqueleto, similar a lo que sucede en una respuesta de escape (Robles-Romo, 2014). Adicionalmente, los organismos tienen que hacer frente a un mayor intercambio osmótico, dada la mayor permeabilidad de un exosqueleto nuevo, el cual tienen que compensar y que también representa un proceso enérgicamente costoso. Las etapas antes y después de la ecdisis representan un estado de compensación fisiológica que se relaciona con la pérdida de la exuvia y que podría considerarse como un estrés endógeno dado que se trata de una repuesta adaptativa dirigida a mantener la homeostasis frente a

ciertos estímulos (desprendimiento del exosqueleto, cambio osmótico, falta de ingesta, entre otros). Aunque la postmuda es una etapa de reducción de la alimentación y de actividad física cuando el camarón se entierra para evitar su rapiña, se produce una alta demanda de energía por la síntesis de la exocutícula y la actividad osmorreguladora que impone la ingesta de agua (Galindo *et al*., 2009; Gómez *et al*., 2012). El estadio de intermuda se considera como el "metabolismo basal" del ciclo, cuando las reservas se almacenan. Posteriormente, en preparación para la ecdisis, el metabolismo aumenta en premuda, aspecto que ha sido evidenciado por el aumento de la tasa metabólica en la premuda alcanzando un pico en la ecdisis y luego un declive y un retorno a los niveles basales en la etapa intermuda (Tabla I).

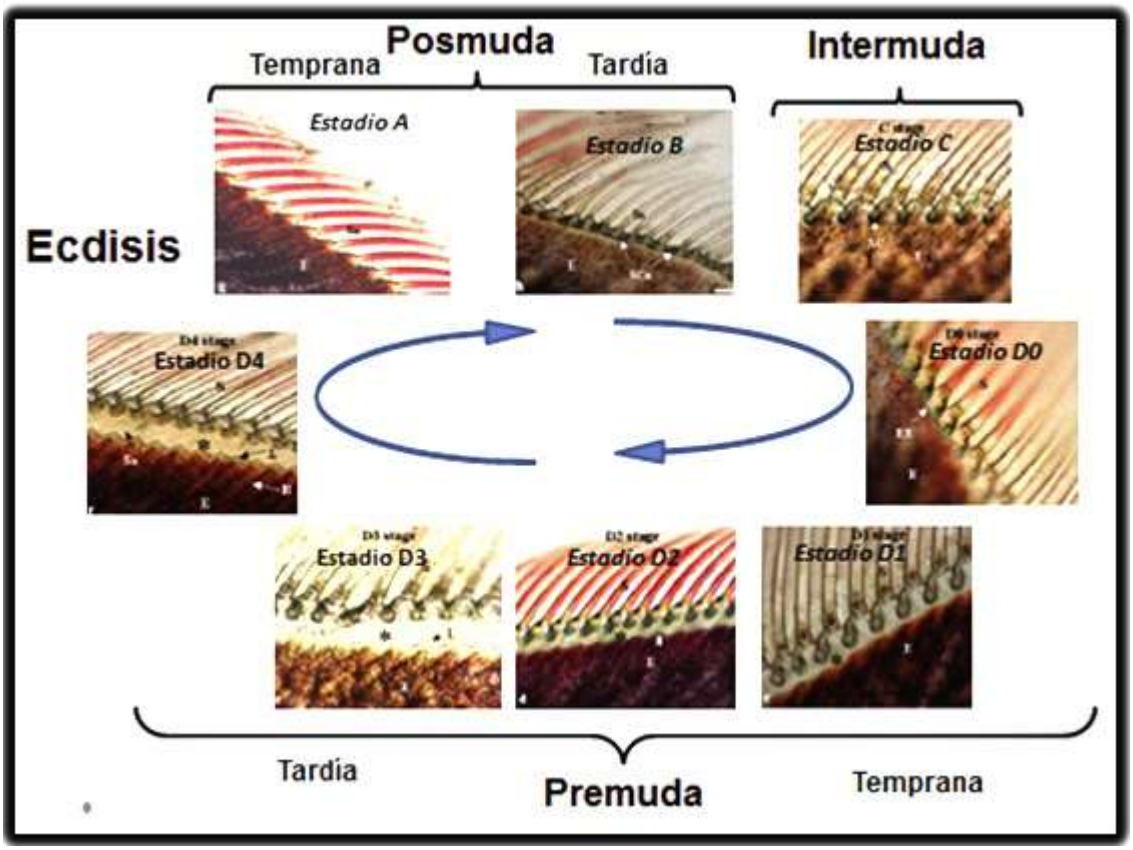


Figura 1. Cambios morfológicos en los urópodos durante el ciclo de muda de *L. vannamei*. Todas las imágenes son de 40 X y animales de tres meses de edad. Tomado y modificado de Cesar *et al*. (2006).

En los peneidos, según las diferentes actividades metabólicas de cada etapa, se han observado diferentes niveles de glucosa, glucógeno y niveles de proteína en hemolinfa y hepatopáncreas, con tendencia a aumentar en postmuda (Cheng *et al*., 2002; Galindo *et al*., 2009; Bonilla-Gomez *et al*., 2012). En cuanto al estado energético celular, solo hay información específica para algunos decápodos, donde se encontró un mayor estado de CEA en músculo en camarón oriental *Macrobrachium nipponense* en premuda y postmuda en comparación con la intermuda, y mayores niveles de ArpP en la langosta americana *Homarus americanus* en postmuda en comparación con intermuda (Tabla II) (Dehn *et al*., 1985; Wang *et al*., 2003).

Tabla I. Consumo de oxígeno en los estadios de premuda-ecdisis, en algunos crustáceos.

Especie	Incremento en el consumo Oxígeno (premuda-ecdisis) %	Referencia
Xiphopenaeus kroyeri	40	Carvalho y Phan, 1998
Palaemon pacificus	50	Emmerson, 1985
Crangon vulgaris	100	Hagerman, 1976
Macrobrachium rosembergii	37	Stern y Cohen, 1982

También el consumo de oxígeno aumenta durante la muda y con ellos, un riesgo de estrés oxidativo, especialmente durante la ecdisis, donde más agentes externos pueden entrar al sistema (Tabla I) (Fanjul-Moles y Gonsebatt, 2012). Sin embargo, no existen reportes de respuesta antioxidante y posible daño celular a nivel de diferentes tejidos, y únicamente se tiene reportado un aumento en los hemocitos de los niveles de expresión de glutation peroxidasa en *Penaeus monodon* en la etapa D0/D1 (Liu *et al*., 2010). En contraste, no se encontraron cambios de la actividad de la glutatión S-transferasa en hepatopáncreas durante el ciclo de muda en el cangrejo violinista, *Uca pugilator* (Hotard y Zou, 2008). Para camarones peneidos y aunque algunos combustibles han sido cuantificados en las diferentes etapas del ciclo de muda de *L. vannamei*, no está

claro cuál es el estado energético de los tejidos y si hay estrés oxidativo durante el ciclo de muda.

Tabla II. Valores de CEA y ArgP (µmol/g) en crustáceos en diferentes etapas del ciclo de muda.

Organismo	CEA	ArgP	ATP/ADP	Estadio/Etapa	Referencia
Homarus americanus	0.95	18.27*	9.62	Postmuda	Dehn *et al.*, 1985
	0.93	9.53	8.36	Intermuda	
	0.94	9.45	8.64	Premuda	
Macrobrachium nipponenese	0.89*			Postmuda (A)	Wang *et al.*, 2003
	0.69			Intermuda (C)	
	0.88*			Premuda (D2)	

* Estadísticamente diferente al estadio de Intermuda.

2.2.1 Estrés oxidativo y defensas antioxidantes

El estrés oxidativo es un desbalance entre antioxidantes y pro-oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas). Este equilibrio se pierde cuando hay una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) o una deficiencia de los mecanismos antioxidantes, lo que puede causar daños a diferentes moléculas (Fig. 2) (Halliwell, 1997; Halliwell, 2009, Betteridge, 2000; Sies, 1991). El sistema antioxidante en animales acuáticos comprende tanto antioxidantes de bajo peso molecular (Glutatión reducido, ácido ascórbico, carotenoides, retinol y alpha-tocoferol) como de alto peso molecular, que incluyen proteínas específicas como las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, las glutatión peroxidasas dependientes de Se) y los asociados a cofactores (glutatión reductasa, glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa). Por otro lado, se encuentran antioxidantes no específicos de alto peso molecular representados por proteínas que previenen el daño inducido por ERO al unirse a iones metálicos de transición (principalmente hierro y cobre) tales como metalotioneínas y ferritina (Livingstone, 2001; Lushchak, 2011).

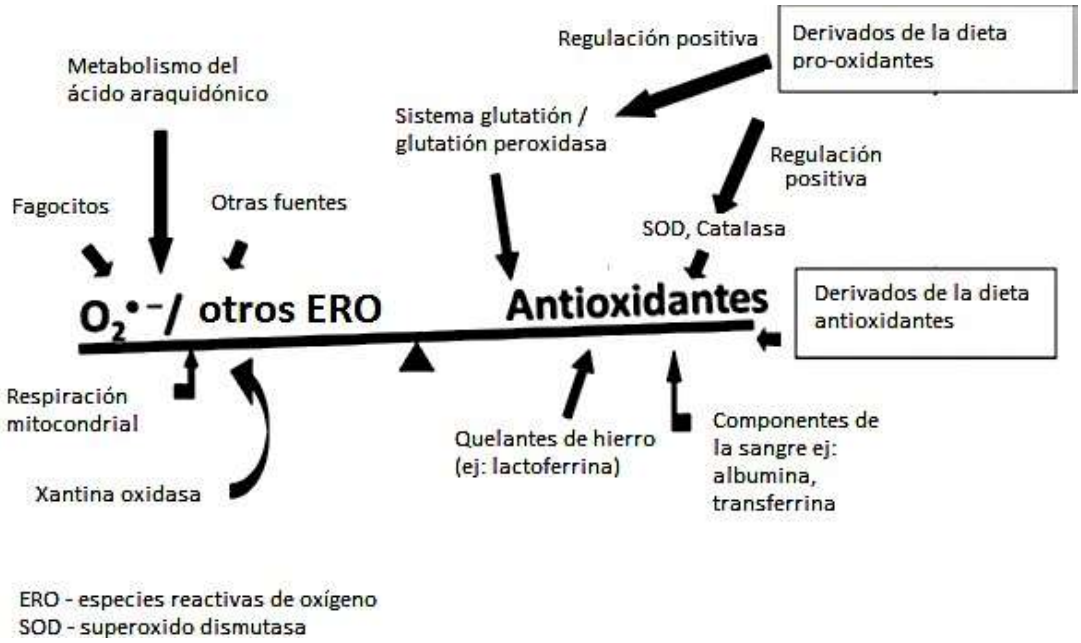


Figura 2. Balance de antioxidantes y especies reactivas *in vivo* (Adaptado de Halliwell, 2009).

Zhu *et al*. (2013) menciona que el sistema antioxidante puede proteger mediante tres mecanismos generales, que se enumeran a continuación:

• Inhibición de la generación de ERO

• Eliminación de ERO ya formada

• Reparación del daño inducido por ERO.

Existen muchos sitios y procesos donde se pueden formar ERO (Fig. 2), por lo que un sistema de defensa antioxidante tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis fisiológica evitando el daño oxidativo, el cual puede causar un daño potencial a biomoléculas, tales como proteínas, ARN, ADN y lípidos poliinsaturados de membrana (Betteridge, 2000; Stadtman y Levine, 2000; Hermes-Lima y Zenteno-Savín, 2002; Halliwell, 2009; Yoshida *et al*., 2012). Las enzimas antioxidantes son interdependientes en la naturaleza y sujetas a variaciones debido a ciclos biológicos intrínsecos, ambiente físico-químicos y contaminantes antropogénicos (Sheehan y Power, 1999). Las enzimas tales como la superoxido dismutasa (SOD) que es una metaloenzima antioxidante con varias

isoformas, que se basan en un ion de metal activo específico, con el fin de lograr la ruptura catalítica del anión superóxido y dependiendo de la molécula de SOD, podría ser un ión de manganeso, hierro, cobre o níquel. Además se distribuye de diferentes maneras en la célula y promueve rápidamente la dismutación del superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Fig. 3) (Gutteridge, 1995; Cizewski-Culotta *et al*., 2006).

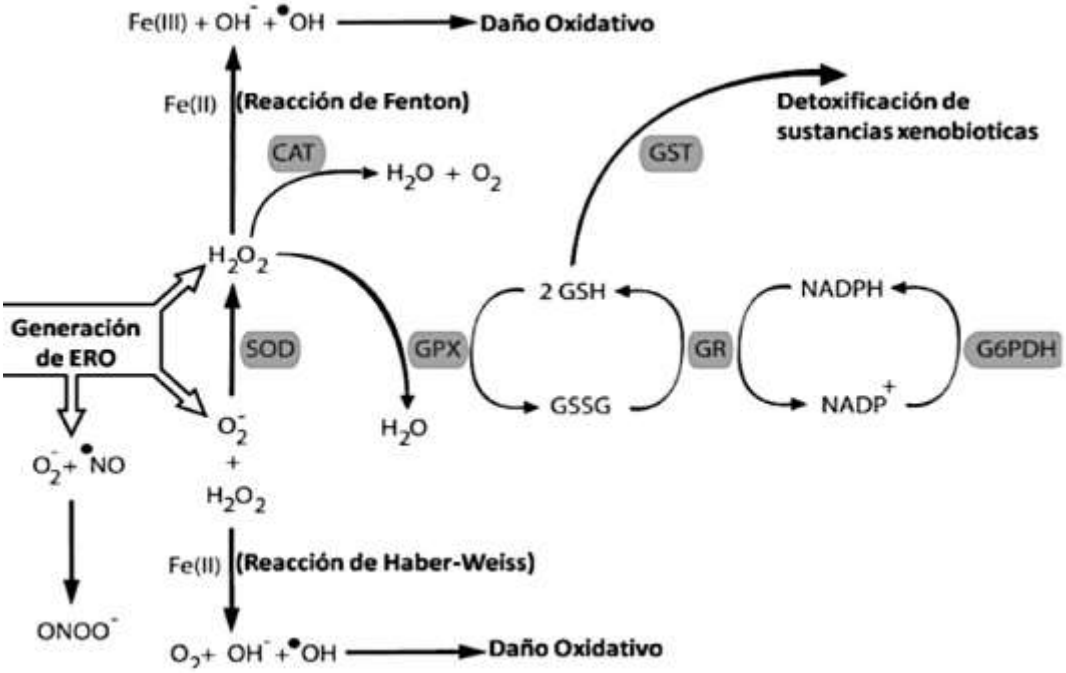


Figura 3. Las defensas antioxidantes enzimáticas trabajan en conjunto para proteger las células contra las especies reactivas del oxígeno. Las abreviaturas SOD, CAT, GST, GR, GPX y G6PDH representan las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-S-transferasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, respectivamente (Tomado y modificado de Hermes-Lima, 2004).

La catalasa (CAT) es una oxireductasa depuradora que se encuentra principalmente presente en los peroxisomas. Cataliza la descomposición de H_2O_2, un producto de la actividad enzimática de SOD, para formar agua y oxígeno molecular (Fig. 3). La catalasa también posee actividades de peroxidasa y oxidasa hacia una serie de sustratos, incluyendo alcoholes (Gutteridge, 1995). La enzima glutatión peroxidasa puede contener selenio o ser independientes de selenio, y se encuentra en el citosol y las mitocondrias de

los tejidos animales, protegiendo las células contra el daño oxidativo mediante la reducción del peróxido de hidrógeno y una amplia gama de peróxidos orgánicos, utilizando el glutatión (GSH) como sustrato reductor durante la fagocitosis y/o el metabolismo fisiológico (Fig. 3) (Wang *et al.* 2012; Halliwell y Gutteridge, 1999).

2.2.2 Peroxidación lipídica

Como ya ha sido mencionado (ver sección 2.2.1), si el equilibrio entre la producción de ERO y los mecanismos antioxidantes se pierde, puede ocurrir daños a las biomoléculas, tales como proteínas, ARN, ADN y lípidos. En este último caso, se le conoce como peroxidación lipídica. La peroxidación de lípidos de un sistema, es un parámetro complejo determinado por la composición de sus ácidos grasos así como de su contenido antioxidante, del tipo de estrés oxidativo utilizado *in vitro* o presente en el medio y del método empleado para medir dicha peroxidación (Logan *et al*., 2013). Aunado a esto, el número de dobles enlaces determina la susceptibilidad de los ácidos grasos a la peroxidación (Wagner *et al*., 1994; Porter *et al.,* 1995). Un doble enlace debilita la unión del átomo de hidrógeno con el carbono adyacente, debido a que sus hidrógenos bis-alílicos requieren menor energía potencial para abstraer un hidrógeno de la cadena acil para formar un radical lipídico, siendo este el primer paso en la peroxidación (Villamena, 2013). Por lo tanto, a mayor número de dobles enlaces en un ácido graso, más fácil resulta remover un átomo de hidrógeno, por lo cual los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son más susceptibles a la peroxidación.

La reacción en cadena de la peroxidación lipídica presenta tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Fig. 4) (Gutteridge, 1995, Allen y Angelo, 1996). La iniciación se da por tres diferentes mecanismos: 1) Oxidación mediada por ERO y/o radicales libres 2) Oxidación causada por agentes físicos (temperatura, luz UV –fotoxidación-, ionización, radiación), 3) Oxidación enzimática (Yoshida *et al*., 2012). Cualquiera de estos tres mecanismos induce la salida de un átomo de hidrógeno, lo que deja un electrón desapareado en el átomo de carbono al cual estaba originalmente unido. En la

propagación la formación del primer ácido graso portador de un radical libre (L•), reacciona rápidamente con el oxígeno para dar un radical peroxilo (LOO•), los LOO• poseen un potencial de reducción mayor al de los radicales L•, por lo que son capaces de sustraer un átomo de hidrógeno de otro ácido graso para formar un hidroperóxido (LOOH) y un radical (L•) lo que podrá generar nuevas cadenas de reacción (formación de otros radicales) por metales reductores, oxidantes, calor o UV (Fig. 4). La formación de nuevas cadenas de propagación antes de la terminación depende de varios factores, por ejemplo, la concentración de oxígeno y los antioxidantes presentes.

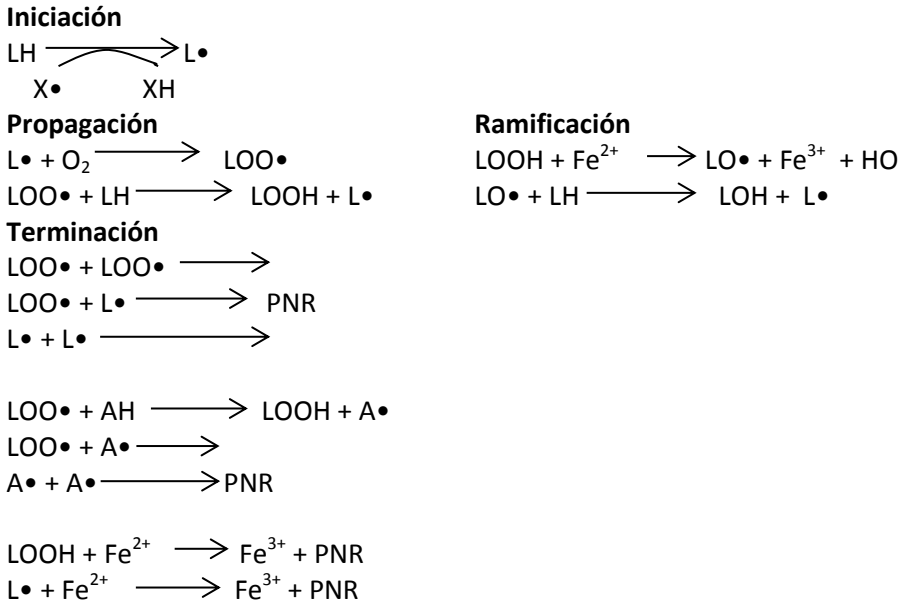


Figura 4. Esquema simplificado de las principales reacciones involucradas en el proceso de peroxidación lipídica. LH: lípido; X•: radical libre iniciador; L•, LO•, LOO•: radicales libres producidos a partir de LH; LOOH: hidroperóxido lipídico; AH: antioxidante; A•: radical libre del antioxidante; PNR: productos no radicales (Tomado de Fagali, 2011).

La descomposición de los hidroperóxidos puede ser estimulada por temperaturas elevadas o por metales de transición (iones hierro y cobre) y genera una mezcla compleja de productos secundarios de peroxidación lipídica como hidrocarburos gaseosos (etano, pentano) y aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxinonenal). La terminación de la peroxidación lipídica ocurre cuando la cantidad de radicales libres incrementa y entonces

pueden darse combinaciones de especies reactivas entre sí para formar productos no radicales o por reacción de estas especies con antioxidantes que actúan donando un átomo de hidrógeno a los radicales L• o LOO• (Fig. 4) (Buettner, 1993).

2.3 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *L. vannamei* en respuesta al estrés de cosecha

Una estimación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación dice que se pierde un tercio de los alimentos cosechados, lo que hace que la reducción de las pérdidas de alimentos sea una prioridad (FAO, 2012). En el caso específico de los mariscos que se venden frescos, el mantener los atributos de frescura implica entonces reducir las pérdidas del producto, lo que señala la necesidad de aumentar la comprensión de los cambios *post mortem*, para mejorar las prácticas de acuicultura con el fin de retrasar la pérdida de calidad posterior a la cosecha (Neil, 2012). La frescura y la calidad nutricional están entre los aspectos más importantes para garantizar la inocuidad de los alimentos en los productos obtenidos del mar para el consumo humano (Gill, 2000; Sikorski y Kolakowski, 2000).

2.3.1 Consecuencia de la cosecha como agente estresante

En mamíferos y peces se sabe que el estrés *ante mortem* tiene un efecto en los cambios *post mortem* que pueden modificar la bioquímica y la calidad de los productos (Fraser *et al*., 1965; Sigholt *et al.*, 1997; Ali *et al*., 1999; Villarroel *et al*., 2003; Kristoffersen *et al*., 2006, Ribas *et al*., 2007; Li *et al*., 2016, Zhang *et al*., 2017). En este sentido un estrés *ante mortem* que consume las reservas glicolíticas del músculo puede disminuir la calidad *post mortem*. Ello se debe a que las reservas de energía relativamente bajas que tiene el músculo son insuficientes para mantener la homeostasis (Gill, 2000; Sikorski y Kolakowski, 2000). El efecto del estrés *ante mortem* en los cambios *post mortem* ha sido menos estudiado en los crustáceos, y es necesario una interpretación práctica de los cambios *post mortem* usando datos específicos de la especie. Los estudios sobre cambios *post mortem* en el camarón *L. vannamei* se han centrado más en la descripción de los cambios

en las propiedades fisicoquímicas, en los índices de calidad y en el deterioro a través del tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas (0-25°C) (Nirmal y Benjakul 2009a, 2009b; García-Sifuentes *et al*., 2012; Takeungwongtrakul *et al*., 2012; Imran *et al*., 2013; Fu *et al*., 2014a; Okpala *et al*., 2014; Okpala, 2015; Huang *et al*., 2016; Qiu *et al*., 2016). Se observa en los estudios que describen la degradación *post mortem* del ATP en *L. vannamei* que el nivel inicial del ATP en el músculo es bastante variable, de 2.6 a 10.3 µmoles g^{-1}, así como el del IMP 1.8 a 0.32 µmoles g^{-1} (Huang *et al*., 2016; Qiu *et al*., 2016). Un valor bajo del ATP sugiere que estos compuestos fueron metabolizados por el posible estrés *ante mortem* asociado con la captura o en el tiempo transcurrido entre la captura y el muestreo (Tabla III), formándose IMP que puede ser usado como un índice del estrés fisiológico que induce la cosecha (Paterson *et al*., 1995). Por lo tanto, el no considerar el efecto de muestreo en los niveles de nucleótidos puede conducir a una subestimación del tiempo posible que el producto puede tener una calidad aceptable, lo que señala la necesidad de una mejor comprensión de las consecuencias de las malas prácticas del manejo en postcosecha. Particularmente en el camarón blanco *L. vannamei* no se ha estudiado el efecto de estrés por captura manejo durante la cosecha tal como ha sido caracterizado para otros decápodos (Tabla III). Se ha investigado otro tipo de situaciones de estrés como la hipoxia *ante mor*tem combinada con ciclos de congelación-descongelación, así como la infección con una bacteria necrotizante del hepatopáncreas, que afectaron la capacidad de retención de agua y las propiedades texturales del músculo (Ramírez-Guerra *et al*., 2012; Avila-Villa *et al*., 2012).

Después del proceso de cultivo, la calidad del camarón y el tiempo viable de anaquel pueden verse considerablemente reducidos por un manejo postcosecha inadecuado, lo que puede reducir la eficiencia de la producción. Aunque las prácticas de cosecha difieren considerablemente en las diferentes escalas de producción, desde el nivel artesanal hasta el industrial, existen condiciones comunes en estas prácticas, que pueden actuar como agentes estresantes *ante mortem*, como la manipulación, las alteraciones físicas, las fluctuaciones de la temperatura o la exposición al aire, en la que el metabolismo aeróbico

se reduce debido a que el consumo de oxígeno es menor que en el agua, y el metabolismo anaeróbico hace frente a la demanda de energía que puede aumentar en respuesta a la manipulación (Whiteley *et al*., 1990; Paterson, 1993).

Tabla III. Fosfato de arginina, nucleótidos y sus productos de degradación por efecto de la captura en diferentes crustáceos.

Especie	ATP µmol g^{-1}	ADP µmolg^{-1}	AMP µmolg^{-1}	IMP µmol g^{-1}	INO µmol g^{-1}	Hx µmol g^{-1}	ArgP µmol g^{-1}	CEA	Tipo y tiempo de cosecha	Ref.
Parapenaeus longirostris	N. D.*	N. D.	2.5	6.26	0.8	0.2			≈10 horas viaje + captura	1
Nephrops norvegicus	1.44 Inv.	1.35	4.45	0.4			0.61	0.31	15 min arrastre	2
	1.44ver.	1.55	6.2	0.4			0.4	0.24	30 min muestreo 1:30 viaje	
Nephrops norvegicus	5.34	0.72	0.07			N.D	9.28	0.87	Sin estrés (basal)	3
	5.3	1.80**	1.60**	0.1		N.D.	4.8	0.71	Creel	
	0.9**	1.3	4.9**	0.5		N.D.	0.13	0.15**	15 min arrastre	
	0.9**	1.5	4.33**	0.4		N.D.	0.15	0.16**	60 min arrastre	
	0.5**	0.9	5.85**	0.6		N.D.	0.13	0.13**	150 min arrastre	
Penaeus Merguensis				5.7		0.075			< 10 horas viaje + captura	4
Penaeus monodon	7.2	0.1	1	0.5	0.4	0.9		0.87	cosecha en estanques de acuicultura con atarraya	5
Penaeus esculentus	7.2		2.3	0.6	0.2	0.1		0.76	cosecha en estanques de acuicultura con túnel de red	
	2.6		2.9	0.7	1	2.8		0.47	Cosecha con red de arrastre durante 15 min.	
L. vannamei	8.76	1.34	0.20				20	0.91**	Canastas (1 min) (basal)	6
	8.24	2.55	0.60				12	0.85	Atarraya (10-15 min)	

*No detectable
**Estadísticamente diferente al basal

Referencias: 1.Goncalves *et al*., 2003; 2.Albalat *et al*., 2010; 3.Albalat *et al*., 2009; 4.Fatima *et al*., 1981; 5. Paterson *et al*., 1995; 6. Zamora-Méndez, 2012

Sin embargo, no hay información disponible sobre la influencia de la emersión *ante mortem* en los cambios *post mortem* del músculo *L. vannamei*. En este sentido la evaluación de la calidad en términos de carga energética es necesaria, con el fin de mejorar las prácticas postcosecha (Fotedar y Evans, 2011; FAO, 2016). Además, la calidad postcosecha también se evalúa por sus características fisicoquímicas (Rahman *et al*., 2000, García-Sifuentes *et al*., 2013, Imran *et al*., 2013). Finalmente, la calidad de los mariscos depende de su alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) de la familia de los n-3 debido a su papel en la salud humana, la disminución de las condiciones inflamatorias y los beneficios cardiovasculares (Calder, 2006; Simopoulos, 2008); Sin embargo, los HUFA son más propensos a la peroxidación que ocurren en condiciones *post mortem* (Hultin, 1994; Takeungwongtrakul *et al*., 2012).

2.3.2 Cambios autolíticos

Las especies marinas, poseen enzimas que realizan actividades fundamentales ordenadas para el desarrollo vital del organismo y al suscitarse la muerte, su actividad en el cuerpo pasa a realizarse de forma desordenada, detectándose reacciones de tipo hidrolítico y oxidativo (Sanjuás, 2012). La autolisis significa “auto-digestión” y se ha encontrado que estas reacciones bioquímicas endógenas son las responsables de las primeras etapas de la degradación en los mariscos (Haard y Simpson, 2000). Tras la muerte, quizás el cambio más notable que ocurre es la falta de oxígeno en el organismo, lo que inicia la mayoría de los cambios pronunciados en la apariencia, textura, química, y el potencial redox. Así pues en la condición *post mortem*, donde el suministro de oxígeno se detiene, la homeostasis de los tejidos puede mantenerse mediante el metabolismo anaeróbico que apoya los procesos anabólicos, hasta que las reservas glicolíticas se puedan utilizar para la producción de energía (Sikorski y Kolakowski, 2000; Gill, 2000).Después de que el ATP se agota (Fig. 5), la degradación autolítica del tejido comienza principalmente por la acción de las caspasas y calpainas y por procesos como apoptosis y necrosis que conducirán a la disrupción celular (Lonergan *et al*., 2010). Esta degradación autolítica está dada principalmente por proteólisis del tejido y en los

crustáceos marinos se produce rápidamente después de la cosecha por la lixiviación de las proteasas digestivas en el músculo (Salem *et al*., 1970), lo que produce cambios en las características fisicoquímicas como el pH, la capacidad de retención de agua, el color y la textura (Sikorski *et al*., 1990, Lonergan *et al*., 2010, Juárez *et al*., 2012, Imran *et al*., 2013, Fu *et al*., 2014a).

2.3.2.1 Degradación de nucleótidos

Por medio de una serie de reacciones de desfosforilación y desaminación que se debe principalmente a la acción de enzimas autolíticas (Fig. 5), el ATP se degrada para formar adenosín difosfato (ADP), adenosín monofosfato (AMP), inosín monofosfato (IMP), inosina (INO) e hipoxantina (Hx) (Gill, 2000).

Los productos de ATP (Fig. 5) y el catabolismo de carbohidratos son los principales factores de pérdida de frescura (Tarr, 1966), algunos productos de degradación del ATP mejoran el sabor (IMP, AMP) mientras que otros (hipoxantina) contribuyen a un sabor amargo y desagradable (Yamaguchi y Ninomiya, 2000; Sarower *et al*., 2012, Yamaguchi *et al*., 1971). En el músculo *post mortem* varias enzimas están implicadas en la degradación de ATP en ADP, AMP e IMP y generalmente tiene lugar dentro de 24 h o menos, mientras que la formación de Hx es el resultado de actividades autolíticas y bacterianas. Por supuesto, varios factores pueden afectar como, la temperatura, la especie, el manejo y la interacción entre ellas (Gill, 2000). Según Qiu (2016) *L. vannamei* presenta dos vías de degradación del ATP durante el almacenamiento refrigerado ATP → ADP → AMP → IMP → HxR → Hx (principal) y ATP → ADP → AMP → Ado → HxR → Hx (secundaria).

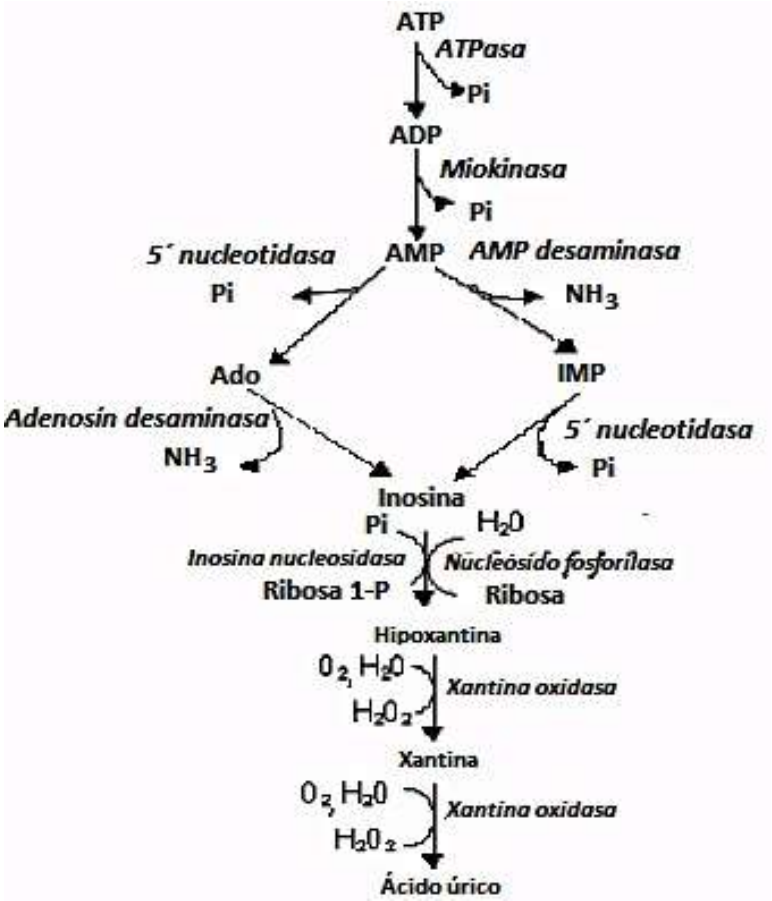


Figura 5. Degradación *post mortem* del adenosin trifosfato (ATP) en peces y crustáceos.

2.3.2.2 Proceso de proteólisis

Se sabe que muchas proteasas endógenas aceleran los cambios bioquímicos y físicos del músculo durante el almacenamiento *post mortem*, lo que afecta a la calidad de los productos cárnicos almacenados y/o procesados (Jiang *et al*., 1992). Entre las proteasas constitutivas importantes en los mariscos se incluyen las presentes en los siguientes tejidos: (1) células musculares; (2) la matriz extracelular y el tejido conectivo que rodea a las células musculares; y (3) órganos digestivos y otros (Haard, 1994). Estos procesos proteolíticos son susceptibles de originar péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que en condiciones adecuadas pueden actuar como nutrientes para el crecimiento microbiano y la producción de aminas biógenas (Aoki y Ueno, 1998; Fraser y Sumar, 1998). Además, inducen la hidrólisis de ciertas proteínas, debilitando la estructura

miofibrilar (Jiang, 2000). Se ha reportado que la autolisis del hepatopáncreas y otros órganos internos promueven la liberación de proteasas activas en el músculo, entre ellas las colagenasas que actúan en la desintegración de colágeno tipo I y V contribuyendo a la separación de las fibras musculares y promoviendo el ablandamiento del músculo en *L. vannamei* y *Macrobrachium rosenbergii* (Ezquerra *et al*., 2003; Sriket *et al.*, 2011). Las pérdidas en las propiedades funcionales de las proteínas se evalúan comúnmente comparando la capacidad de retención de agua, la viscosidad, la gelificación y la emulsión (Xiong, 1997).

2.3.2.3 Proceso de lipolisis y peroxidación lipídica post mortem

Los camarones presentan un gran contenido en enzimas (lipasas, fosfolipasas, entre otras) capaces de hidrolizar lípidos de peso molecular elevado (triglicéridos y fosfolípidos, fundamentalmente), formando ácidos grasos libres de menor peso molecular, los cuales son más reactivos, pudiendo interaccionar con otros constituyentes. La oxidación de los lípidos es una importante reacción de deterioro en los alimentos que a menudo resulta en una pérdida significativa de calidad, como la decoloración de pigmentos, la destrucción de ciertos nutrientes y la posible formación de subproductos tóxicos; esto puede impactar en tres características de calidad sensorial: aspecto/color, textura y sabor (Gray y Pearson, 1994). Los alimentos de origen marino se caracterizan por su elevada composición lipídica insaturada, lo que los hace más susceptibles a la oxidación (Angelo, 1996; Shahidi, 1998). Sin embargo, la oxidación de los lípidos no sólo depende del grado de instauración, también se ve afectada por otros componentes presentes en la matriz alimenticia, así como las condiciones bajo las cuales se almacena el producto (Shahidi, 1998). Morrisey *et al*. (1994), mencionan que el proceso de peroxidación lipídica comienza antes del sacrificio y continua durante el almacenamiento, proceso que se puede acentuar sí existen agentes estresantes *ante mortem* (ver sección 2.2.2). Además, los eventos *post mortem* alteran el equilibrio entre factores pro-oxidantes y antioxidantes (Min y Ahn, 2005) que en conjunto con ciertos procesos enzimáticos y no enzimáticos pueden ocasionar la oxidación de lípidos (Aubourg, 1999), lo que a su vez puede resultar

en una disminución en la calidad del producto debido principalmente a la degradación de los lípidos y rancidez (Okpala, 2016).

2.3.3 Métodos para la evaluación de la calidad alimentaria en productos marinos

2.3.3.1 Calidad de un alimento

Según Hui (2007), la calidad de un alimento se define desde dos perspectivas: la científica (la composición, el deterioro, los aditivos, la contaminación y la seguridad general) y las preferencias del consumidor que están directamente vinculadas a los sentidos humanos (olor, gusto, percepción visual y sensación en la boca).

Así mismo, Bourne (2002) menciona que existen cuatro principales atributos que definen la calidad en los alimentos:

1. Apariencia, que comprende color, forma, tamaño y brillo entre otros entre otros
2. El aroma y sabor, que es la respuesta de los receptores en las cavidades oral y nasal a los estímulos químicos.
3. La textura, que es principalmente la respuesta de los sentidos táctiles a los estímulos físicos que resultan del contacto entre alguna parte del cuerpo y la comida.
4. La nutrición, se refiere a que debe satisfacer las necesidades nutricionales del consumidor y comprende la concentración de nutrientes como: carbohidratos, lípidos, proteínas, minerales, vitaminas y fibra entre otros nutrientes.

En relación a la calidad *post mortem* de un alimento, existe un incremento a nivel mundial en los consumidores que solicitan alimentos de alta calidad, seguros y saludables (Haard, 1993; Huss *et al*., 2003). Sin embargo, los camarones tienen características anatómicas y fisiológicas que causan una vida útil corta (8-12 días) cuando se conservan en hielo y la calidad se pierde rápidamente (Fatima *et al*., 1981; Okpala *et al*., 2014, Canizales-Rodríguez *et al*., 2015). La frescura es una de las cualidades más importantes de los mariscos; Un producto *post mortem* será mejor aceptado cuanto más similar es al producto *in vivo* (Gill, 2000; Sikorski y Kolakowski, 2000). Para la evaluación de la frescura

y calidad de los productos pesqueros, se han propuesto varios métodos: químicos, físicos, microbiológicos y sensoriales.

2.3.3.2 Métodos químicos

Los métodos bioquímicos y químicos se caracterizan por ser cuantitativos por lo que son más objetivos, fiables y seguros para indicar deterioro (Huss, 1998). Algunos de los procedimientos de mayor utilidad para la medición objetiva de la calidad de los productos pesqueros son las bases volátiles totales (BVT), la medición de nucleótidos y productos de degradación (ver sección 2.3.2.1) y métodos relacionados con cambios en la fracción lipídica (Huss, 1998).

2.3.3.3 Métodos físicos

Existen números métodos físicos para la determinación de la calidad de mariscos y entre los más utilizados se encuentran los siguientes:

2.3.3.4 Determinación del pH muscular

Las mediciones se llevan a cabo mediante un pH-metro, colocando los electrodos directamente dentro de la carne o dentro de una suspensión de la carne en agua destilada (Huss, 1998).

2.3.3.5 Análisis del perfil de textura

La integridad muscular se debe principalmente a la función que tienen las proteínas estructurales presentes y pequeñas modificaciones de estas proteínas pueden producir cambios importantes en la textura de pescados y mariscos. La textura limita la vida útil de pescados y mariscos, lo que impide su comercialización. En *L. vannamei* la textura del músculo es uno de los componentes principales de aceptabilidad y es influenciado por varios factores, como la tasa y el alcance de la disminución *post mortem* del pH, así como la tasa y el alcance de la proteólisis que conduce a la descomposición de miofibrillas (Sriket *et al*., 2011; Wang *et al*., 2015).

La textura se define como la “manifestación sensorial y funcional de la propiedad estructural, mecánica y de superficie de los alimentos detectada a través de los sentidos de la vista, el oído, el tacto y cinestético“(Szczesniak, 2002). Esta naturaleza multivariable involucra varios tejidos y receptores en la percepción de la textura, de manera que toda la información registrada por estos receptores se lleva instantáneamente al sistema central nervioso y de allí al cerebro (Szczesniak, 2002). Szczesniak y Kahn (1971) mencionan que la textura permanece normalmente en el subconsciente. Cuando la textura de un producto es psicológicamente y fisiológicamente aceptable y como uno espera que sea, entonces pasará desapercibida. En cambio, la conciencia de la textura aumenta cuando se violan las expectativas, cuando se evocan asociaciones no alimentarias o cuando se producen experiencias sensoriales desagradables.

Para poder entender la naturaleza multidimensional de la textura es importante definir las propiedades texturales, así como sus magnitudes. Por lo tanto, es necesaria una nomenclatura internacional estándar para asegurar que todas las investigaciones llevadas a cabo en diferentes países se refieren a las mismas propiedades (Bourne, 2002). La Dr. Alina S. Szczesniak, señaló la naturaleza multidimensional de la textura y su importancia para el consumidor y desarrolló los principios del análisis de perfil de textura para los métodos tanto instrumental como sensorial (Bourne, 2002). Así mismo Szczesniak (2002) intento introducir algún orden y clasificó las sensaciones de estos términos en ciertas categorías (Tabla IV).

Tabla IV. Definiciones de los parámetros mecánicos de la textura (Szczesniak, 2002).

	Propiedades primarias	
	Físicas	***Sensoriales***
Dureza	Fuerza necesaria para alcanzar una deformación dada	Fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los molares (en caso de sólidos) o entre la lengua y el paladar (en el caso de semisólidos)
Viscosidad	Extensión a la que un material puede ser deformado antes de que rompa	Grado en que una sustancia es comprimida entre los dientes antes de romper
Elasticidad	Velocidad de flujo por unidad de fuerza	Fuerza requerida para llevar un líquido de la cuchara a la lengua.
Cohesividad	Velocidad a la que un material deformado vuelve a su condición inicial después de que la fuerza que causa la deformación es retirada	Grado en que un producto vuelve a su forma original una vez ha sido comprimido entre los dientes
Adhesividad	Trabajo necesario para superar las fuerzas atractivas entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los que el alimento entra en contacto	Fuerza requerida para eliminar el material que se adhiere a la boca (generalmente al paladar) durante el proceso normal de comer
	Propiedades secundarias	
Fracturabilidad	Fuerza con la que un material fractura: un producto con una alta dureza y un bajo grado de cohesividad	Fuerza con la que una muestra se desmigaja, agrieta o se hace pedazos
Masticabilidad	Energía requerida para masticar un alimento sólido hasta el estado adecuado para ser tragado: un producto con dureza, cohesividad y elasticidad	Periodo de tiempo requerido para masticar la muestra, a una velocidad constante de fuerza aplicada, para reducirla a una consistencia adecuada para tragar
Gomosidad	Energía requerida para desintegrar un semisólido a un estado listo para ser tragado: un producto con un bajo grado de dureza y alto grado de cohesividad	Espesura que persiste durante la masticación; energía requerida para desintegrar un semisólido a un estado adecuado para tragar

2.3.3.6 Colorimetría

El color es la percepción que resulta de la detección de la luz después de haber interactuado con un objeto. El color percibido de un objeto se ve afectado por tres entidades: la composición física y química del objeto, la composición espectral de la

fuente de luz que ilumina el objeto y la sensibilidad espectral del ojo del espectador (Schubring, 2009).

El color puede considerarse tanto subjetivamente como objetivamente. Lo subjetivo, se refiere a lo que se percibe después de que la luz entra en el ojo, es decir lo psicosensorial, el brillo, luminosidad, matiz, saturación, tonalidad y la cromaticidad. La tonalidad se refiere a la sensación visual según el cual un área parece exhibir un color más o menos cromático y en algunos alimentos puede ser definida por el estado químico del pigmento. El matiz se entiende como el atributo descrito por los nombres de color rojo, verde, morado, entre otros. La saturación es la intensidad de color en proporción a su brillo, mientras que la cromaticidad es la tonalidad en relación con el brillo del entorno. Así mismo la luminosidad no es afectada por la intensidad de la iluminación porque es la proporción de luz reflejada, mientras que la sensación de brillo aumenta con el nivel de iluminación y en algunos alimentos cárnicos puede estar dado en función del estado físico de la superficie de la carne (MacDougall, 1994; Schubring, 2009).

Los términos objetivos, es decir, los psicofísicos, están relacionados con el estímulo y en alimentos por lo general se evalúan mediante instrumentos llamados colorímetros que mide en un espacio de color independiente del dispositivo, es decir, CIELab (L *, a *, b *) (Fig. 6). El colorímetro permite la medición del color sólo en un modo de contacto y para una pequeña área de la muestra (Macdougall, 1994; Schubring, 2009; Romaniello *et al*., 2015). Este sistema emplea las coordenadas tricromáticas L* (luminosidad), a* (matiz rojo-verde) y b* (matiz amarillo-azul), de manera que a partir de relaciones entre ellas se pueden obtener las coordenadas colorimétricas, ángulo de matiz (formula 1), cromaticidad (fórmula 2) e índice de blancura (fórmula 3) (Schubring, 2009).

$$h^* = \tan^{-1} (a^* / b^*) \quad (1)$$

$$C^* = (a^* 2 + b^* 2)^{½} \quad (2)$$

$$\text{Índice de blancura} = 100-([100-L^2)+a^2+b2]^{0.5} \quad (3)$$

Como ya se ha mencionado, la apariencia general de un alimento es extremadamente importante y consiste en color, tamaño, forma y uniformidad del alimento (Botta, 1994; MacDougall, 1994; Romaniello *et al*., 2015). Sin embargo el color es uno de los parámetros de calidad que se ven afectados por el almacenamiento por que cambia con la disminución de la frescura (Schubring, 2009). En general, el color y la apariencia afectan la percepción del consumidor en otras modalidades sensoriales influyendo en el concepto de frescura (Lawless y Heymann 1998 en Schubring 2009). La coordenada L* es la más relacionada con la valoración visual del consumidor (Murray, 1989) y depende de varios factores como el pH, la capacidad de retención de agua, la humedad, la integridad de la estructura muscular el contenido de lípidos y el grado de oxidación de los pigmentos (Palombo y Wijngaards, 1990).

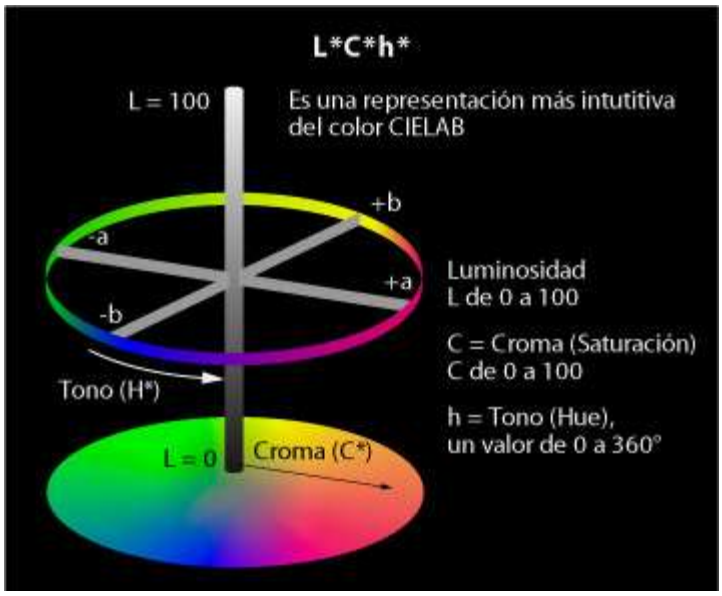


Figura 6. Espacio de color CIE L*a*b*.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen una serie de indicadores de la respuesta fisiológica de estrés, que se basan en el estudio de los procesos bioenergéticos en los organismos, los cuales permiten entender de qué manera se obtiene, se almacena, se transfiere y se utiliza la energía para mantener las funciones vitales de los organismos y como se ajustan estos procesos en etapas o situaciones particulares de demanda energética. El estrés implica entonces un incremento en el consumo de adenosín trifosfato (ATP) que tiene que compensarse por un aumento en la producción del mismo para poder mantener el balance energético celular inferido por la carga energética adenílica (CEA) (Atkinson y Walton, 1967; Moal *et al*., 1989; Wang *et al*., 2002; Morris *et al*., 2005). Por lo tanto, la CEA podrá variar dependiendo de la condición fisiológica y los agentes estresantes a los que esté sometido el organismo.

Según Passano (1960) antes y después de la ecdisis, ocurren los mayores eventos metabólicos asociados con el crecimiento. Durante el proceso fisiológico del ciclo de muda en *Litopenaeus vannamei*, ocurren fluctuaciones del estado energético celular asociado a cambios en la actividad metabólica además de existir riesgo de estrés oxidativo. Por otro lado durante el cultivo de camarón *L. vannamei*, el proceso de cosecha implica condiciones estresantes como la persecución, emersión y confinamiento. Un estrés *ante mortem* podría reducir la vida útil de los camarones. Lo anterior hace necesario cuantificar y caracterizar la respuesta de estrés en términos de estatus energético celular así como el sistema enzimático antioxidante y el daño oxidativo ante un factor de estrés endógeno (muda) y exógeno (proceso de cosecha) así como su repercusión en la calidad postcosecha. Los datos derivados de este estudio podrán ser utilizados para mejorar las prácticas de cultivo, estrategias de manejo y además contar con indicadores de susceptibilidad a estrés.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1

El proceso de muda puede considerarse como una situación de estrés que implica ajustes metabólicos y una posible alteración en el estatus energético celular en *L. vannamei*.

Hipótesis 2

En un cultivo comercial de *L. vannamei* el proceso de cosecha puede implicar una respuesta de estrés que repercutirá en los procesos bioquímicos *post mortem* y la calidad del producto final.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta de estrés en términos de estatus energético celular, metabolitos implicados y defensa enzimática antioxidante, ante un factor de estrés endógeno (muda) y exógeno (cosecha) así como su repercusión en la calidad postcosecha de *L. vannamei*.

5.1 Objetivos particulares

1.- Analizar las variaciones en la energía metabólica disponible (CEA y fosfágenos), los combustibles y reservas, el sistema enzimático antioxidante y el daño oxidativo en hepatopáncreas y músculo del camarón blanco *L. vannamei* durante el ciclo de muda.

2.- Cuantificar en un cultivo semi-intesivo de *L. vannamei* la influencia de dos variantes en el proceso de cosecha con atarraya a borde de un estanque, sobre la respuesta metabólica *ante mortem*, en términos de carga energética adenílica, procesos bioquímicos involucrados y su repercusión *post mortem* en las variables ya mencionadas así como en sus propiedades organolépticas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

6.1.1 Metabolismo energético y actividad enzimática antioxidante durante el ciclo de muda de *Litopenaeus vannamei*

Los organismos utilizados para este experimento fueron obtenidos del laboratorio de Reproducción de crustáceos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), donde se encontraban en contenedores con capacidad de 5000 L, Estos organismos se mantenían bajo condiciones controladas: 28°C de temperatura, fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, aireación constante, 36-38 ups, recambio de agua diario reponiendo el volumen perdido por el sifoneo, alimentación a saciedad tres veces por día (9:00, 14:00 y 19:00 h) con una dieta comercial que contenía 35% de proteína (PIASA, La Paz, B.C.S., México).

Para la recolección de organismos en cada estadio del ciclo de muda, se monitoreo la etapa de muda de cada camarón a las 0, 48 y 72 h la última observación (72 h) se realizó al momento del muestreo para confirmar en última instancia la etapa en que se muestreó. El estadio de muda se determinó por la observación de los urópodos laterales bajo un microscopio a 20x basado en Promwikorn *et al*. (2004) y Cesar *et al*. (2006). Los camarones fueron asignados aleatoriamente e individualmente a tanques de 30 litros (las condiciones del agua, la alimentación y el mantenimiento fueron los mismos para los contenedores de 5000 L). Al momento de cambiar los organismos a sus respectivas javas individuales, se realizó observación de urópodos para la evaluación inicial del estadio de muda (tiempo 0). Una vez trasladados los camarones, se realizó una inspección diaria para las 17 taras registrando la temperatura, animales muertos o mudas de camarón que fueron extraídas junto con los desperdicios de comida y heces. Se realizó una segunda observación y determinación del estadio de muda 48 h después de haber sido trasladados los organismos, donde cada camarón fue recogido suavemente con una red de cuchara y el urópodo a observar fue colocado sobre una lámina de vidrio y observado al microscopio

y se registró el peso (34.7 ± 6.5 g, media ± desviación estándar, N = 81) con una balanza de campo. Las observaciones se realizaron lo más rápido posible 1 min aproximadamente y los camarones fueron colocados nuevamente en su respectivo acuario. Esto se realizó para poder elegir que organismos serán ayunados a partir de ese momento para su posterior muestreo. El criterio utilizado para elegir que organismos se van a muestrear fue el número de muestra mínima que se necesitaba, nueve camarones por estadio de muda. Los organismos a muestrear se dejaron sin perturbación y se alimentaron por última vez a las 12:00 h sifoneandose restos de alimento no consumido a las 15:00 h. Se tomaron muestras de camarón al día siguiente a las 09:00 h (18 h de ayuno). En el caso de los estadios B, C, D0, D1, D2, D3 y D4 el muestreo fue de la siguiente manera: cada camarón se retiró manualmente del tanque, para evitar el movimiento de la respuesta de escape, luego se cortó un urópodo lateral, después los camarones se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -76°C. El urópodo muestreado se observó en menos de 1 minuto después de que se cortó y se fijó en solución Davidson para análisis histológicos posteriores (Promwikorn *et al.*, 2007). Para el muestreo de los camarones en el estadio E, se esperaba que mudaran por la noche los camarones en estadio D4, por lo que se quedaron sin alimentos desde las 9:00 h. Los camarones fueron monitoreados durante la noche hasta que se desprende la exuvia e inmediatamente es muestreado como se describió anteriormente. El procedimiento para el muestreo del camarón en estadio E se realizó durante la noche con sólo el 15% de la luz utilizada durante el día, para no perturbar a los camarones. Los camarones en estadio A se muestrearon entre 12 y 24 horas después de la ecdisis, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los organismos sacrificados se remplazaron por organismos nuevos hasta completar nueve replicas por cada estadio de muda (E, A, B, C, D0, D1, D2, D3 y D4) es decir 81 muestras. Se utilizó el primer segmento abdominal de camarón para medir los nucleótidos adenílicos, el ArgP, los combustibles y las reservas de energía (proteínas totales, lípidos totales, triacilglicéridos, glucógeno, colesterol y lactato), el segundo segmento abdominal para analizar indicadores de estrés oxidativo. También se

analizaron los combustibles, las reservas y los indicadores de estrés oxidativo en hepatopáncreas.

6.1.2 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *Litopenaeus vannamei* en respuesta al estrés de cosecha

Se obtuvieron las muestras biológicas de una finca comercial (Servicios Acuícolas Profesionales, Bahía de Ohuira, estado de Sinaloa, México), donde se encontraban en un cultivo semi-intensivo (300 camarones m^{-2}), en estanques revestidos de plástico de 1 ha con aireación constante y bajo fotoperiodo natural.

Este experimento se hizo emulando una cosecha normal con atarraya a pie del estanque y se utilizaron camarones *L. vannamei* con peso de 13±1 g en estadio de intermuda. En el momento del muestreo (19:00 h), el agua en el estanque era de 24°C, 36 ups, y la concentración de oxígeno disuelto de 4.1 mg L^{-1}. El proceso consiste en capturar los organismos masivamente con una atarraya en menos de 1 minuto y colocar la captura en un recipiente (de dimensiones 0.5 x 0.35 x 0.31 m, capacidad de 54.3 L), se realizaron dos lances obteniéndose un aproximado de 300 camarones por lance de la atarraya. En total se colectaron 180 organismos que fueron sometidos a dos condiciones distintas, la primera condición (grupo estrés por emersión) consistió en colocar a los organismos obtenidos en el primer lance (aprox. 300 organismos) en una tara durante 15 min en condiciones de exposición aérea, confinamiento y temperatura ambiente, para posteriormente colectar 90 organismos y mantenerlos durante 144 h en agua-hielo a una temperatura de aprox. de 0°C. Los organismos del segundo grupo (grupo control-sin estrés por emersión) inmediatamente después de la cosecha fueron colocados en agua-hielo durante un periodo de 144 h. Los organismos del tiempo cero, del grupo control sin estrés fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de ser capturados, mientras que para los organismos del grupo estrés, el tiempo cero se consideró una vez transcurridos los 15 min de emersión. Los camarones se lavaron luego con agua dulce, se pusieron en bolsas de polietileno (n = 10 / bolsa) por cada condición y tiempo de

muestreo *post mortem*: 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 o 144 h en hielo triturado. Cuando era necesario, el agua de deshielo se drenó y se incorporó nuevo hielo para mantener 0°C. Finalmente las muestras fueron transferidas al laboratorio de "Análisis de Alimentos Marinos" en la Universidad Autónoma de Baja California Sur (U.A.B.C.S.), para sus análisis posteriores. El primer segmento abdominal fue utilizado para análisis de ArgP/nucleótidos, incluyendo subproductos y análisis bioquímicos. Los segmentos abdominales restantes se utilizaron para el análisis de lípidos, pH, agua expresable, perfil de textura y color. Al tiempo cero, únicamente se realizaron de ArgP así como de nucleótidos y sus productos de degradación, mientras que el resto de los análisis sólo se hizo a partir de las 12 h, dado que el equipo necesario no estaba disponible en el campo.

6.2 Métodos analíticos

6.2.1 Extracción, procesamiento y cuantificación de nucleótidos y fosfágenos

Los siguientes análisis se realizaron en el laboratorio de "Metabolismo energético" del CIBNOR y se realizaron en todas las muestras (ver sección 6.1.2 y 6.1.3). La cuantificación de nucleótidos adenílicos, productos de degradación y ArgP se realizó en el músculo en ambos experimentos. La extracción y el análisis de los nucleótidos adenílicos se realizó siguiendo la metodología descrita por Moal *et al*. (1989) y Le Coz (1989) con algunas modificaciones de Robles-Romo *et al*. (2014). Se pesaron aproximadamente 150 mg de tejido congelado del primer segmento abdominal y se pulverizó en condiciones criogénicas (nitrógeno líquido) en un molino mezclador de acero inoxidable (MM400, Retsch, Haan, Alemania) a una frecuencia de 25 s^{-1} durante dos minutos y se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 ml a -76°C. Posteriormente, aproximadamente 150 mg de músculo pulverizado se homogenizó en 1.5 mL de TCA 0.5 M frio, mediante un homogenizador mecánico de flecha (modelo Tempest IQ2, The VirTis Company, Gardiner, USA) a 3,000 rpm por 30 s). El homogenizado obtenido se centrifugó a 3,000 *g* a 4°C por 10 min, después de lo cual se recuperaron 0.5 mL del sobrenadante. A éste se adicionó 1.3 mL de una mezcla (1:5) recién preparada de trioctilamina y diclorometano y se mezcló

vigorosamente sobre un vórtex por 30 s. Después, la mezcla se centrifugó a 2,000 *g* por 5 min a 4°C, y se verificó que el pH del sobrenadante obtenido estuviera entre 6 y 7 con papel indicador de pH; cuando el pH fue más ácido, se agregó una cantidad adicional de la mezcla de trioctilamina y diclorometano y el pH se verificó nuevamente. El sobrenadante resultante se separó en 4 alícuotas de 50 µL que fueron almacenadas a -76°C hasta su posterior análisis.

6.2.2 Condiciones de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la cuantificación de nucleótidos (ATP, ADP, AMP, IMP, Hx, GTP y GDP)

La cuantificación se realizó por HPLC (modelo 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) de fase reversa de intercambio iónico con base en la metodología descrita por Le Coz (1989) y Moal *et al*. (1989), con algunas modificaciones Robles-Romo *et al*. (2014). Se utilizó una columna Hyperclone ODS (C18) 3 µm (tamaño del diámetro de partícula) 150 x 4.6 mm de largo y ancho, respectivamente (Phenomenex, Torrance, CA), con una precolumna (C18) (40 mm de largo y 3.0 mm de ancho, Phenomenex, Torrance, CA). La separación de los analitos se realizó utilizando como fase móvil 0.15 M de NaH_2PO_4, 3 mM de tetrabutilamonio como el agente de par iónico, 8% de metanol, cuyo pH se ajustó a 6 con NaOH 5 N. El cromatógrafo se operó a un flujo de 0.8 mL min^{-1}, el tiempo de separación fue de 20 min. Los nucleótidos se detectaron a 254 nm (Detector Agilent acoplado al sistema de HPLC). La identificación y el cálculo de la concentración de los nucleótidos se realizó con base en los estándares de ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, IMP e hipoxantina (Sigma, St. Louis, MO), utilizando las concentraciones que se indican en el párrafo siguiente. Todos los solventes utilizados para los análisis de HPLC se prepararon utilizando reactivos grado HPLC y agua desionizada, filtrando todas las soluciones antes de utilizarse. Se realizaron curvas de calibración de los cinco nucleótidos (AMP, ADP, ATP, GTP y GDP). El rango de las concentraciones analizadas para cada nucleótido fue 0.017 hasta 4.24 µg en 25 µL inyectados (Anexo I). Se utilizó una mezcla de estándares para cada corrida de muestras cuya concentración de nucleótidos es similar a la encontrada en tejidos de camarón. Se preparó una solución madre de cada nucleótido (ATP, ADP, AMP,

GTP y GDP) en una concentración aproximada de 0.5 mg mL^{-1} utilizando agua desionizada. A partir de ésta se realizó una dilución 1:100 con solución amortiguadora (fase móvil utilizada) obteniéndose así una solución diluida de cada nucleótido de 5 µg mL^{-1}. Posteriormente, se realizó una mezcla de nucleótidos a partir de estas soluciones diluidas. Finalmente, se transfirieron 100 µL de la mezcla anterior en viales ámbar y se almacenaron a -76 °C: estos viales son los que se inyectaron en cada corrida. También se utilizaron estándares de IMP e hipoxantina con concentraciones de 0.21 y 2.47 nmoles, respectivamente, en 25 µL inyectados.

6.2.3 Condiciones del HPLC para la cuantificación fosfato de arginina

A partir del mismo extracto utilizado para la cuantificación de los nucleótidos, se cuantificaron por HPLC los niveles de ArgP siguiendo las indicaciones descritas por Viant *et al*. (2001). La cuantificación se realizó por HPLC de fase reversa utilizando una columna SphereClone NH2 (tamaño de partícula de 5 µm de diámetro, 250 mm de largo y 4.6 mm de ancho, Phenomenex, Torrance, CA), la columna se acopló a una precolumna NH2 (40 mm de largo y 3 mm de ancho, Phenomenex, Torrance, CA), utilizando una fase móvil a base de KH_2PO_4 20 mM (ajustada a pH 2.6 con H3PO4) y acetonitrilo en una proporción 72:28. El tiempo de corrida fue de 20 min a un flujo de 1 mL min^{-1}. Se utilizaron las mismas condiciones de pureza en reactivos y agua que para el análisis de nucleótidos. La identificación y el cálculo de la concentración se realizó con base en un estándar de ArgP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a partir del cual se realizó una curva estándar cuyo un rango de concentración de 0.06 y 3.80 µg inyectados en 25 µL (lo que equivale a 0.20 y 12.5 nmoles en 25 µL) (Anexo II). La solución madre se preparó disolviendo 5 mg del estándar en 1 mL de agua desionizada, a partir de la solución anterior se preparó una dilución 1:30 con una solución 20 mM de KH_2 PO_4 ajustada a pH 7 y a partir de ésta se realizaron diluciones seriales. La solución de trabajo del estándar, que se inyectó en cada corrida, se preparó mediante una dilución 1:60 de la solución madre con 20 mM de KH_2 PO_4 ajustado a pH 7; de la anterior, se tomaron alícuotas de 100 µL que se almacenaron en viales ámbar a -76°C (6.26 nmoles en 25 µL inyectados).

6.2.4 Reservas, combustibles y metabolitos

Los siguientes análisis se realizaron en el laboratorio de "Bioquímica Fisiológica" del CIBNOR en músculo en ambos experimentos y únicamente en hepatopáncreas en el experimento de muda (sección 6.1.1). De los tejidos, se obtuvo una porción (≈100 mg) de músculo del primer segmento abdominal y de hepatopáncreas, aun estando congelados los tejidos, se pesaron y liofilizaron. El tejido liofilizado fue nuevamente pesado para obtener el peso seco y se hidrató con 1 mL de solución isotónica (450 mM NaCl y 10 mM KCl). En músculo se cuantificaron; proteínas totales, glucógeno, lípidos totales y lactato, mientras que en hepatopáncreas, se cuantificaron; glucógeno, lípidos totales, proteínas totales, triglicéridos y colesterol.

6.2.4.1 Proteínas totales

Se utilizó la técnica de Bradford (1976) para cuantificar la concentración de proteínas totales, utilizando albúmina sérica bovina (Sigma, Steinheim, Alemania) como estándar referencia. En músculo y hepatopáncreas, una alícuota del tejido homogenizado se le agregó la solución reactiva de Bradford en tubo de ensayo, se tomó una alícuota de la reacción y se colocó en microplaca para leerse en un lector de microplaca (Multiskan spectrum, Thermo Fisher Scientific) a 595 nm.

6.2.4.2 Lactato

La cuantificación de la concentración del lactato se realizó con base en la metodología descrita por Racotta y Palacios (1998), con adecuación a microplaca utilizando 20 µL de muestra. Para realizar la cuantificación (método enzimático-PAP Randox laboratories limited), al homogenizado de tejido en solución isotónica se le agregó TCA al 20%, se centrifugó a 800 *g* y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de lactato; se realizó la detección con un lector de microplaca a 540 nm, se cuantificó tomando como referencia una curva estándar (0.31-20.0 mg dL^{-1}) con el sustrato. Se utilizaron 20 µL del sobrenadante libre de proteínas y 200 µL de la solución reactiva del kit.

6.2.4.3 Triglicéridos

La determinación de, triglicéridos se realizó con base en la metodología descrita por Racotta y Palacios (1998), con adecuación a microplaca utilizando 20 µL de muestra y se realizó mediante un kit comercial basado en el método GPO-PAP (Randox laboratories limited), se realizó la detección con un lector de microplaca a 540 nm, se hicieron reaccionar 20 µL del homogenado de tejido y 200 µL de solución reactiva del kit, se tomó como referencia una curva estándar (3.13-200 mg dL^{-1}) del sustrato.

6.2.4.4 Lípidos totales

Con base en la metodología descrita por Barnes y Balckstock (1973) a una alícuota de plasma u homogenado de tejido (20 µL) se le agregaron 200 µL de ácido sulfúrico concentrado y se incubó en un baño maría a 90°C por 10 min; posteriormente, se tomó una alícuota de la reacción anterior, se colocó en una microplaca y se le agregó fosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80%, se dejó incubar la reacción por 40 min, y se registró la absorbancia de las muestras a 540 nm. Se utilizó una solución estándar de lípidos como referencia (0.19 – 12.05 mg mL^{-1}) (Lin-Trol Sigma L2648).

6.2.4.5 Glucógeno

Con base en lo descrito por Van Handel (1965), las proteínas se precipitaron del homogenizado de tejido, agregando TCA al 20%, posteriormente, se precipitó el glucógeno presente utilizando etanol frio y se centrifugó (3600 *g*), se eliminó el sobrenadante y se secaron las muestras en un horno a 76°C. A continuación, las muestras se hidrataron a un volumen conocido (0.1 mL), se agregó antrona al 0.1% en H_2SO_4 al 72% se incubaron las muestras a 90°C por 5 y 10 min (músculo y hepatopáncreas respectivamente) y se leyó la absorbancia a 620 nm en un lector de microplaca (curva 3.91-250 mg dL^{-1}).

6.2.4.6 Colesterol

Para colesterol total, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX, No. catalogo CH 200). El colesterol se determinó después de una hidrólisis

enzimática y oxidación. Se tomó una alícuota de plasma de 20µL y se puso en el fondo de una microplaca, se le agregaron 200µL de solución reactiva, se incubaron 10 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a una absorbancia de 540 nm.

6.2.5 Histología

El siguiente análisis se realizó en el laboratorio de "Histología e Histoquímica" del CIBNOR y se realizó solo en los organismos del bioensayo de muda descrito en la sección 6.1.1. Los 81 urópodos fijados en Davison se deshidrataron en una serie progresiva de concentraciones crecientes de alcohol etílico (70% a 100%) en el laboratorio de histología e histoquímica del CIBNOR. Posterior a la deshidratación, las muestras fijadas en Davison se aclararon en xilol y se incluyeron en parafina (Paraplast X-Tra, Mc Cormick Scientific, San Diego, CA, USA). A cada urópodo se le realizaron cortes de 4 µm de grosor con ayuda de un microtomo rotatorio (Leica RM 2155, Leica Microsystems) y se colocaron en portaobjetos. Posteriormente se desparafinaron las muestras, para ser teñidas con Ácido Periódico de Shiff (PAS) (Spicer *et al*., 1964) y hematoxilina (Humanson, 1979). Por último se examinaron las secciones de tejido teñidas, con un microscopio óptico (Olympus BX 50) y fotografiados con una cámara digital (CoolSNP-Pro) conectado al microscopio.

6.2.6 Indicadores de estrés oxidativo y actividad de enzimas antioxidantes

Las metodologías que se describen a continuación fueron implementadas previamente en el laboratorio de "Estrés Oxidativo" del CIBNOR y se realizaron solo en los organismos del bioensayo de muda descrito en la sección 6.1.1. Una muestra (~100 mg) de músculo del segundo segmento abdominal o del hepatopáncreas se disectó aun congelada, se disgregó y se homogenizó (Polytron PT 1300D Kinematica AG, Lucerne, Suiza) en una solución compuesta de solución amortiguadora (pH 7) fosfato de potasio (0.1 M) fluoruro de fenilmetanosulfonilo (1mM) y EDTA (60 mM) en una relación 1:20 peso tejido/volumen de solución. El homogenado se centrifugó a 3,000 *g* por 10 min a

4°C, se recuperó el sobrenadante y se utilizó para el análisis de la actividad de las de enzimas antioxidantes, los niveles de peroxidación lipídica (TBARS).

6.2.6.1 Superóxido dismutasa

La actividad total de la superóxido dismutasa (SOD) se determinó a 25°C con base en el porcentaje de inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT por sus siglas en inglés) por una fuente exógena de radical superóxido (O_2), el sistema de xantina/xantina oxidasa, con base en la metodología de Suzuki, (2000). El blanco o la muestra se mezclaron en una celda que contenía 1 U mL^{-1} de xantina oxidasa disuelta en sulfato de amonio (2 M) y una solución de carbonato de sodio (50 mM), xantina (0.1 mM), NBT (0.025 mM) y EDTA (0.1 mM). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm (DU 800, Beckman coulter, Fullerton, California) cada 30 s por 5 min y se calculó el cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo para cuantificar la disminución de la reducción del NBT. Una unidad de actividad de SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la máxima reacción de O_2 con NBT.

6.2.6.2 Catalasa

La actividad de catalasa (CAT) se determinó con base en lo descrito por Aebi (1984). Directamente en la celda de cuarzo se agregó una alícuota del sobrenadante del tejido homogenanizado, se agregó la solución reactiva que contenía H_2O_2 (en un rango de 0.45 y 0.5 mmoles L^{-1}) en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 mM), el ensayo se realizó a 25°C y se cuantificó el decremento de la absorbancia a 240nm (ΔA_{240}) debido al consumo de H_2O_2. Una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 µmol de H_2O_2 min^{-1}.

6.2.6.3 Glutatión peroxidasa

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) dependiente de selenio se analizó siguiendo la metodología de Flohé y Günzler (1984). Una alícuota (50 µL) del sobrenadante del homogenizado de tejido se depositó en una celda de plástico en donde se agregaron posteriormente una mezcla a base de solución amortiguadora de fosfato de

potasio (2 mM, pH 7.2), azida de sodio (2 mM), glutatión (250 mM), NADPH (1.5 mM), EDTA (50 mM), glutatión reductasa (15 U mL^{-1}), y H_2O_2 (10 mM) como sustrato. Se midió el cambio en la absorbancia (espectrofotómetro DU 800, Beckman coulter, Fullerton, California) a 340 nm cada 40 s durante 3 min, lo que permitió calcular el consumo de NADPH. Una unidad de GPx es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de NADPH min^{-1}.

6.2.6.4 El valor de Peróxido (LOOH)

El siguiente análisis se realizó en el laboratorio de "Metabolismo energético" del CIBNOR y se realizó solo en el bioensayo de calidad *post mortem* descrito en la sección 6.1.2. El contenido de LOOH se estimó a partir del extracto de cloroformo-metanol (2:1 v/v) por el método de tiocianato férrico (Chapman y Mackay, 1949; Mihaljevic *et al*., 1996), utilizado para un tesis paralela que contempló el análisis de ácidos grasos y clases de lípidos (Marin, 2016). Con lectura de absorbancia a 505 nm en un lector de microplacas (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), utilizando hidroperóxido de cumeno (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) como estándar.

6.2.6.5 Peroxidación de lípidos (TBARS)

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se cuantificaron con base en lo descrito por Persky *et al*. (2000). Se utilizaron 250 µL del mismo sobrenadante ya descrito en la sección 6.2.4, se incubó en un baño con agua con agitación continua por 15 min a 37°C en agitación, en baño maría, posteriormente la reacción se detuvo agregando 12.5% de TCA en HCl (1.0 M), se agregó ácido 2-tiobarbiturico al 1% y se procedió a una incubación a 90°C por 10 min. Las muestras se enfriaron en un baño de agua fría y se centrifugaron a 3000 *g* por 10 min a 4°C. El sobrenadante se colectó y se leyó a 530 nm en un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlandia). El contenido de TBARS se calculó a partir de una curva estándar (1-20 nmoles mL^{-1}) de malondialdehído bis-dietilacetal en etanol. Los datos se expresaron como nmol de TBARS mg^{-1} de proteína

6.2.7 Análisis fisicoquímicos

Estos análisis se realizaron solamente en músculo del experimento calidad *post mortem* (sección 6.1.2) en el laboratorio de "Análisis de Alimentos Marinos" en la Universidad Autónoma de Baja California Sur (U.A.B.C.S.).

6.2.7.1 Valoración del pH

El pH se monitoreo durante el tiempo de almacenamiento postcosecha del camarón. Este análisis se realizó mediante un método no destructivo utilizando un electrodo de punción (HI9025C, Hanna Instruments, Woonsocket, RI), en el segundo segmento abdominal. Las mediciones se realizaron introduciendo el electrodo dentro del músculo del organismo.

6.2.7.2 Medición del color

El color del músculo del camarón fue evaluado mediante el sistema de colorimetría de triestímulo (Francis y Clydesdale, 1975), empleando un colorímetro Minolta™ CR-400 (CR-400, Konica Minolta, Tokio). El colorímetro fue ajustado en el modo de reflectancia, con una apertura en el puerto de lectura de 0.5 cm. El puerto de lectura se colocó perpendicular a la superficie del músculo y posteriormente se hizo incidir sobre él un haz de luz del equipo. Con este procedimiento se registraron automáticamente los parámetros de color L* (luminosidad), a* (matiz rojo-verde) y b* (matiz amarillo-azul), ángulo de matiz (H°) y cromaticidad (C*). Se realizaron dos lecturas para cada muestra camarón; la primera de ellas parte externa (PE) en un costado del camarón del segundo segmento abdominal sin caparazón. Posteriormente, se hizo un corte transversal separando el cefalotórax más el primer segmento abdominal y la segunda lectura se realizó en la parte interior (PI) del abdomen del primer segmento abdominal.

6.2.7.3 Análisis de perfil de textura (APT)

La textura del músculo fue evaluada mediante la metodología descrita por Szczesniak *et al*. (1963), utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems™ Godalming, Surrey, U.K.), empleando una celda de compresión de 5 kgf. Se determinó el

perfil de textura utilizando muestras cilíndricas del segundo segmento abdominal obtenidas con un horadador de 1 cm. de diámetro ajustando la altura del cilindro a 1 cm. Para esto se seleccionó una velocidad de deformación de 60 mm min^{-1} y se aplicaron dos ciclos de compresión utilizando un cilindro de 5 cm de diámetro adaptado al texturómetro. Las muestras se colocaron en la parte central del plato del texturómetro y fueron sujetas a una deformación del 50% con respecto a su altura inicial. Los parámetros obtenidos mediante esta prueba fueron dureza, cohesividad y elasticidad.

6.2.7.4 Agua expresable (AE)

El agua expresable (AE) se midió, según Rahman *et al*. (2000) con algunas modificaciones: se colocaron 1 g de músculo entre una doble capa de papel de filtro (Whatman nº 1), luego se aplicaron dos ciclos de compresión, utilizando un cilindro de 5 cm de diámetro y una fuerza de compresión de 5 kgf (formula 4).

AE (%) = ((Peso inicial – peso final) / Peso inicial) × 100) (4)

6.3 Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el paquete Statistica versión 8.0 (Dell Statistica, Tulsa, OK). La normalidad de las muestras se verificó con la prueba Shapiro Wilk, y la homogeneidad de varianza se determinó utilizando la prueba Levene. Cuando los datos no fueron normales y/o no hubo homogeneidad de varianzas se aplicaron diferentes transformaciones (logaritmo, raíz cuadrada o inverso multiplicativo).

Los datos se compararon por análisis de varianza de una vía para el experimento del ciclo de muda y en el experimento de cosecha y calidad *post mortem* se aplicó un análisis t de Student para analizar el tiempo 0 entre los grupos de estrés por emersión y control, además de un análisis de varianza de dos vías (emersión x tiempo de almacenamiento). La comparación de medias se realizó por la prueba Tukey HSD. Las diferencias se reportaron como significativas a $P<0.05$ o $P<0.01$ los datos se reportaron como media ± error estándar.

7. RESULTADOS

7.1 Resultados del metabolismo energético y actividad enzimática antioxidante durante el ciclo de muda de *Litopenaeus vannamei*

Tabla V. Variables bioquímicas en músculo de *L. vanammei* (Media ± E.S.) durante el ciclo de muda.

	MÚSCULO			
Estadio	**PT mg g^{-1}**	**GCG mg g^{-1}**	**LAC mg g^{-1}**	**LT mg g^{-1}**
A	140.6±15.5	3.1±0.4	1.7±0.2	15.0±1.9
B	155.4±19.6	2.5±0.4	1.9±0.1	14.4±1.3
C	137.4±14.3	2.5±0.6	1.7±0.4	13.8±1.4
D0	134.3±19.0	2.5±0.4	1.9±0.2	16.42.5
D1	146.8±22.3	2.2±0.3	1.9±0.1	14.4±1.8
D2	159.2±17.4	3.1±0.6	2.3±0.3	18.3±3.5
D3	110.0±14.8	3.5±0.6	2.3±0.2	14.3±1.3
D4	164.2±25.6	3.1±0.4	2.1±0.1	17.1±2.4
E	181.3±23.2	2.5±0.3	1.7±0.2	14.7±1.1

Las concentraciones se expresan en mg g^{-1} de peso húmedo. Los resultados se expresan como media ± error estándar. Proteínas totales (PT), glucógeno (GCG), lactato (LAC) y lípidos totales (LT). Diferencia significativa ($P<0.05$), N=9.

Tabla VI. Variables bioquímicas en hepatopáncreas de *L. vanammei* (Media ± E.S.) durante el ciclo de muda.

	HEPATOPÁNCREAS				
Estadio	**PT mg g^{-1}**	**GCG mg g^{-1}**	**LT mg g^{-1}**	**TG mg g^{-1}**	**COL mg g^{-1}**
A	112.8±11.7	12.6±2.1^{b}	167.8±49.1	6.0±1.6	1.7±0.4
B	107.4±6.6	8.9±0.9^{ab}	275.0±47.1	10.7±2.7	4.0±1.1
C	108.6±10.5	9.5±0.9^{ab}	208.9±40.6	9.4±2.3	2.6±0.4
D0	122.3±3.8	12.0±1.1^{b}	289.1±63.2	7.8±1.9	2.9±0.5
D1	129.4±11.9	12.0±1.5^{b}	274.9±53.6	10.7±3.0	2.4±0.5
D2	137.6±8.9	11.9±1.8^{b}	308.5±23.9	11.2±4.1	2.4±0.4
D3	110.0±6.3	9.3±0.7^{ab}	166.0±39.6	8.4±1.6	2.0±0.2
D4	119.8±11.3	11.1±1.5^{b}	269.7±55.8	10.8±2.8	3.9±1.9
E	103.0±10.0	6.7±0.8^{a}	204.9±39.7	4.7±0.7	2.3±0.2

Las concentraciones se expresan en mg g^{-1} de peso húmedo. Los resultados se expresan como media ± error estándar. Proteínas totales (PT), glucógeno (GCG), lípidos totales (LT), triglicéridos (TG) y colesterol (COL). Diferencia significativa ($P<0.05$), N=9.

Los resultados de los análisis bioquímicos obtenidos en músculo abdominal y hepatopáncreas para este experimento no presentaron diferencias significativas en su mayoría para las variables analizadas (Tablas V y VI), con excepción del glucógeno en el hepatopáncreas que sí presentó diferencias significativas ($P<0.05$) a la largo del ciclo de muda, particularmente con un disminución significativa de 39.6% entre estadio de premuda tardía D4 (11.1 mg g^{-1}) y el de ecdisis (6.7 mg g^{-1}) para volver a aumentar a 12.6 mg g^{-1} en estadio de postmuda temprana. Posteriormente, se observa nuevamente una disminución no significativa del 29% en el estadio de postmuda tardía B, seguido de pequeñas variaciones durante el resto de los estadios (Ttabla VI).

En el estadio E, para nucleótidos de alta carga de energía, se observó un incremento significativo del 58% para el ATP (Fig. 7a) y del 79% para el GTP (Fig. 8c), aunque la concentración de éste último fue 50 a 100 veces menor que el ATP. Estos incrementos están asociados a una disminución significativa del ADP y AMP (Fig. 7b y c), resultando en conjunto en incrementos significativos para la CEA (19%, Fig. 7e) y la relación ATP/ADP (154%, Fig. 7f) entre el estadio de ecdisis y los de intermuda o premuda temprana. En todos los casos, se observan niveles intermedio en los estadios de postmuda (A y B) y premuda tardía (D4). No se observaron diferencias significativas en los niveles totales de nucleótidos, aunque también se observó un tendencia a incrementarse en el estadio E (Fig. 7d). Para los productos de degradación, el IMP tendió a niveles más bajos al avanzar el ciclo de muda con diferencias significativas entre los estadios D3, mientas que la hipoxantina mostró el mismo patrón que le ATP con un incremento significativo entre el estadio E y D1, con niveles intermedio para los estadio de postmuda y premuda tardía Fig. 8c. Finalmente, ese mismo patrón fue observado para los niveles de ArgP, con un incremento de cuatro veces entre el estadio de premuda temprana D0 y la ecdisis (Fig. 8e).

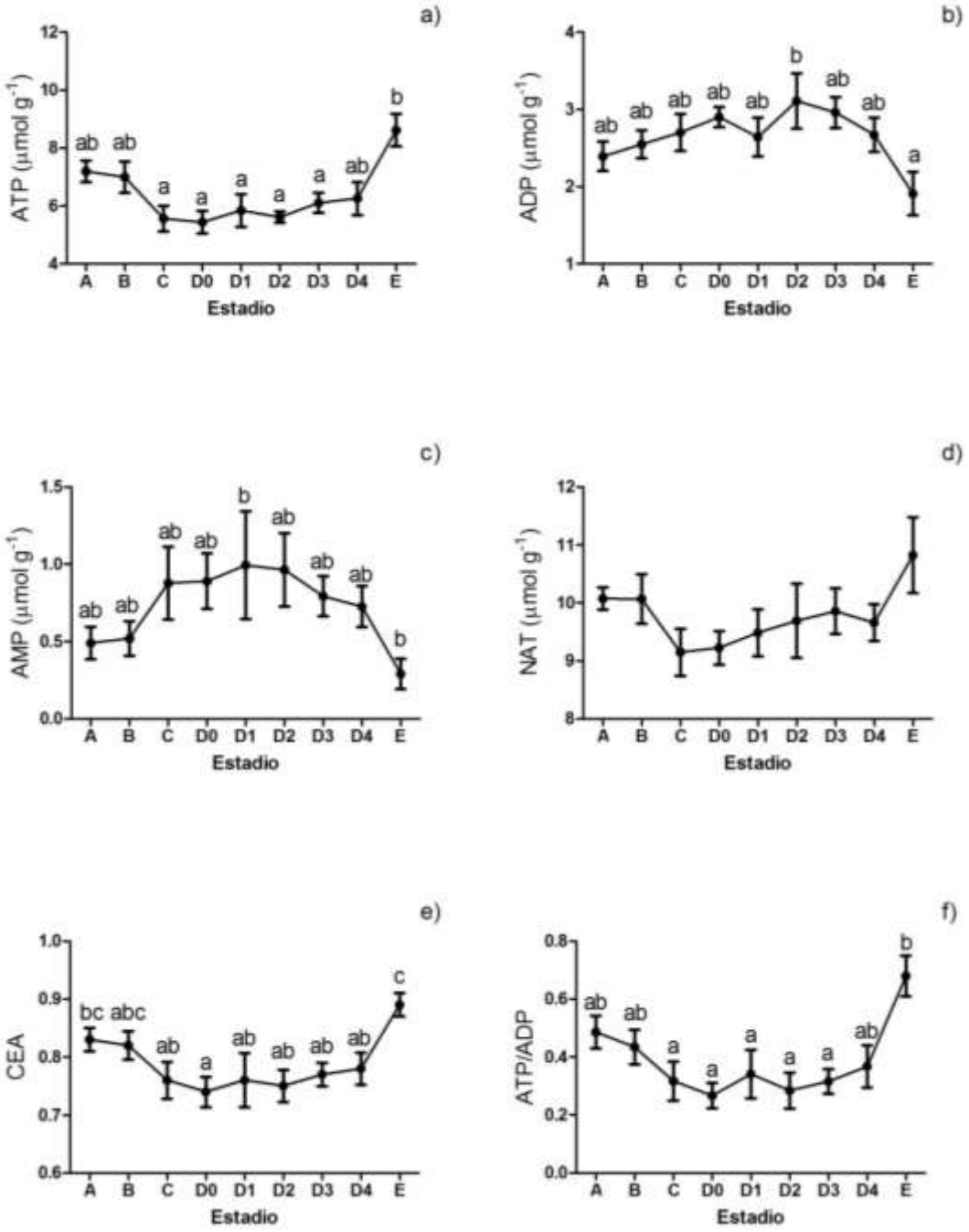


Figura 7. Concentraciones de (a) ATP (adenosín trifosfato), (b) ADP (adenosín difosfato), (c) AMP (adenosín monofosfato), (d) y NAT (nucleótidos adenílicos totales), así como valores calculados de (e) CEA (carga energética adenílica), y (f) relación ATP/ADP en el músculo abdominal de *L. vannamei* durante los diferentes estadios del ciclo de muda. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias individuales sólo cuando el ANOVA fue estadísticamente significativo ($P<0.05$). Los datos se presentan como media ± SE, n = 9 camarones para cada estadio.

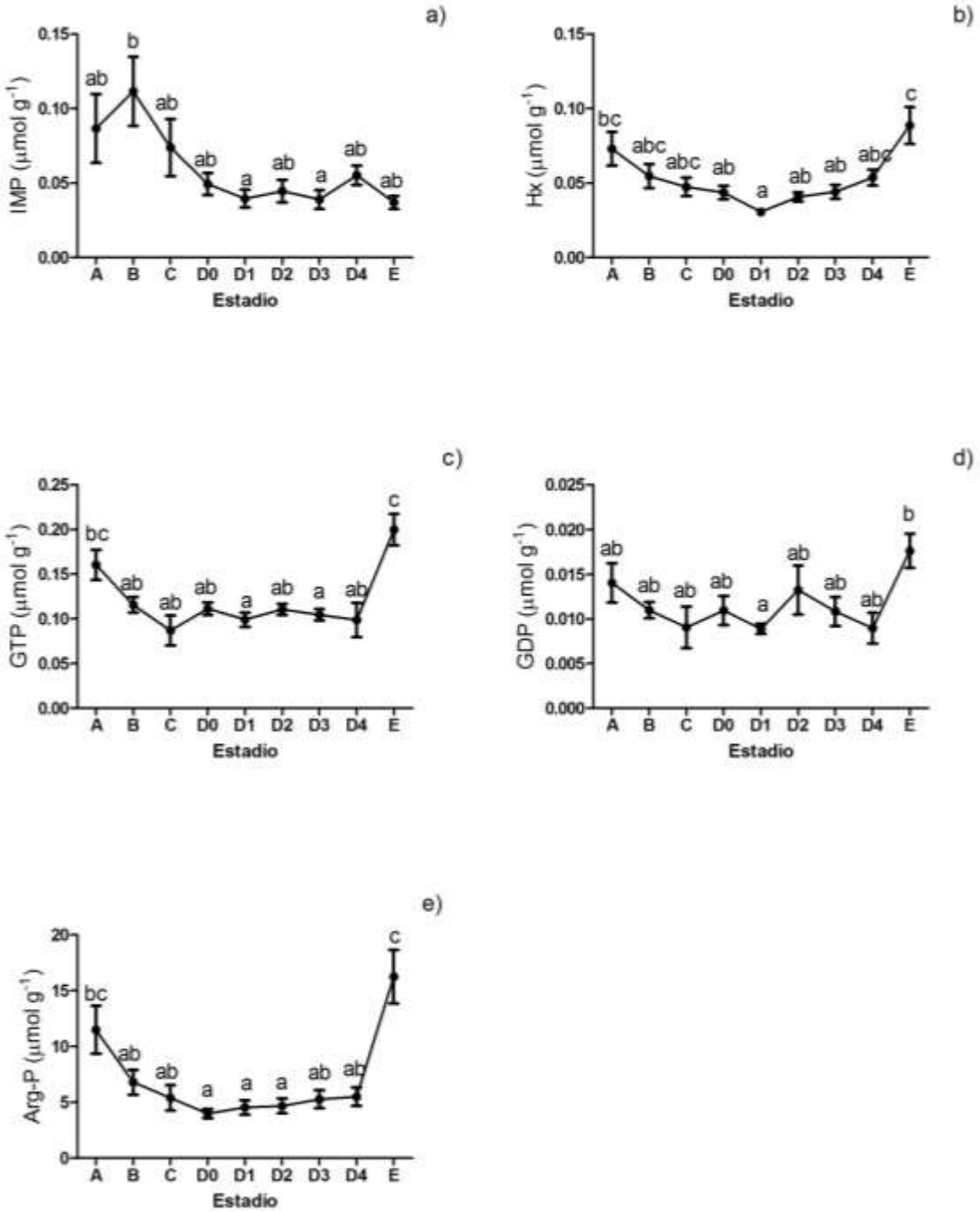


Figura 8. Concentraciones de (a) IMP (Inosina monofosfato), (b) Hx (Hipoxantina), (c) GTP (Guanosín trifosfato), (d) GDP y (Guanosín difosfato) (e) ArgP (fosfato de arginina) en el músculo abdominal de *L. vannamei* durante los diferentes estadios del ciclo de muda. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias individuales sólo cuando el ANOVA fue estadísticamente significativo ($P<0.05$). Los datos se presentan como media ± SE, n = 9 camarones para cada estadio.

7.1.1 Actividad enzimática antioxidante

En hepatopáncreas la actividad de SOD fue 2.4 veces mayor (P<0.01) en estadio de postmuda con respecto al de intermuda. El mismo patrón se observó en el músculo donde incrementó 2.6 veces (P<0.01) del estadio E al A (tabla VII). Para, la actividad de CAT en el hepatopáncreas y el músculo no se observaron cambios significativos durante el ciclo de muda; sin embargo, la actividad de CAT en músculo fue muy baja y no fue detectada en el estadio de intermuda (Tabla VII). La actividad de GPx en hepatopáncreas incrementó en un 84% (P<0.05) durante la ecdisis con respecto a la intermuda (Tabla VII), mientras que no se observaron cambios significativos en el músculo. Los TBARS aumentaron progresivamente en un 150% (P<0.05) desde el estadio C al A en el hepatopáncreas, mientras que en el músculo no se vieron afectados durante el ciclo de muda.

Tabla VII. Niveles de sustancias reactivas al TBARS, SOD, GPx y catalasa CAT en hepatopáncreas (HP) y músculo (M) en tres estadios seleccionados del ciclo de muda de *L. vannamei* (N = 6 para cada grupo).

Estadio		**TBARS (nmols mg proteína^{-1})**	**GPx (U mg proteína^{-1})**	**SOD (U mg proteína^{-1})**	**CAT (U mg proteína^{-1})**
HP	A	1.10±0.19^{b}	0.70±0.11^{ab}	179.80±21.17^{b}	27.06±3.26
	C	0.44±0.09ª	0.56±0.08ª	65.69±11.24ª	22.84±3.02
	E	0.50±0.08ª	1.03±0.12^{b}	74.23±7.21ª	23.03±5.48
M	A	0.26±0.05	0.68±0.10	140.01±9.43^{b}	6.89±2.45
	C	0.21±0.06	0.49±0.10	88.56±11.58ª	
	E	0.16±0.03	0.51±0.09	53.60±9.22ª	10.30±3.67

Los resultados se expresan como media ± error estándar. Diferencia significativa (P<0.05).

7.1.2 Histología

Para el estadio C (Fig. 9), se observan cuatro capas desde exterior al interior, una epicutícula (1), una exocutícula (2), una endocutícula (3) y una capa membranosa (4). Durante los estadios D3-D4 (Fig. 13 y 14) empieza a sintetizarse la cutícula pre-ecdisial compuesta por una nueva epicutícula (5) y una nueva exocuticula (6) debajo de la antigua. Los organismos del estadio E (Fig. 15) solo presentan esta nueva epicuticula y exocuticula formada en premuda tardía ya que ha sido arrojada la antigua cutícula, he inmediatamente al paso de unas horas los organismos del estadio A (Fig. 16) se puede observar la formación de una nueva endocutícula muy delgada, que en el siguiente estadio “B” (Fig. 17) se verá notablemente su incremento en grosor, mientras que la exocutícula se ve disminuida en grosor.

Estadio C

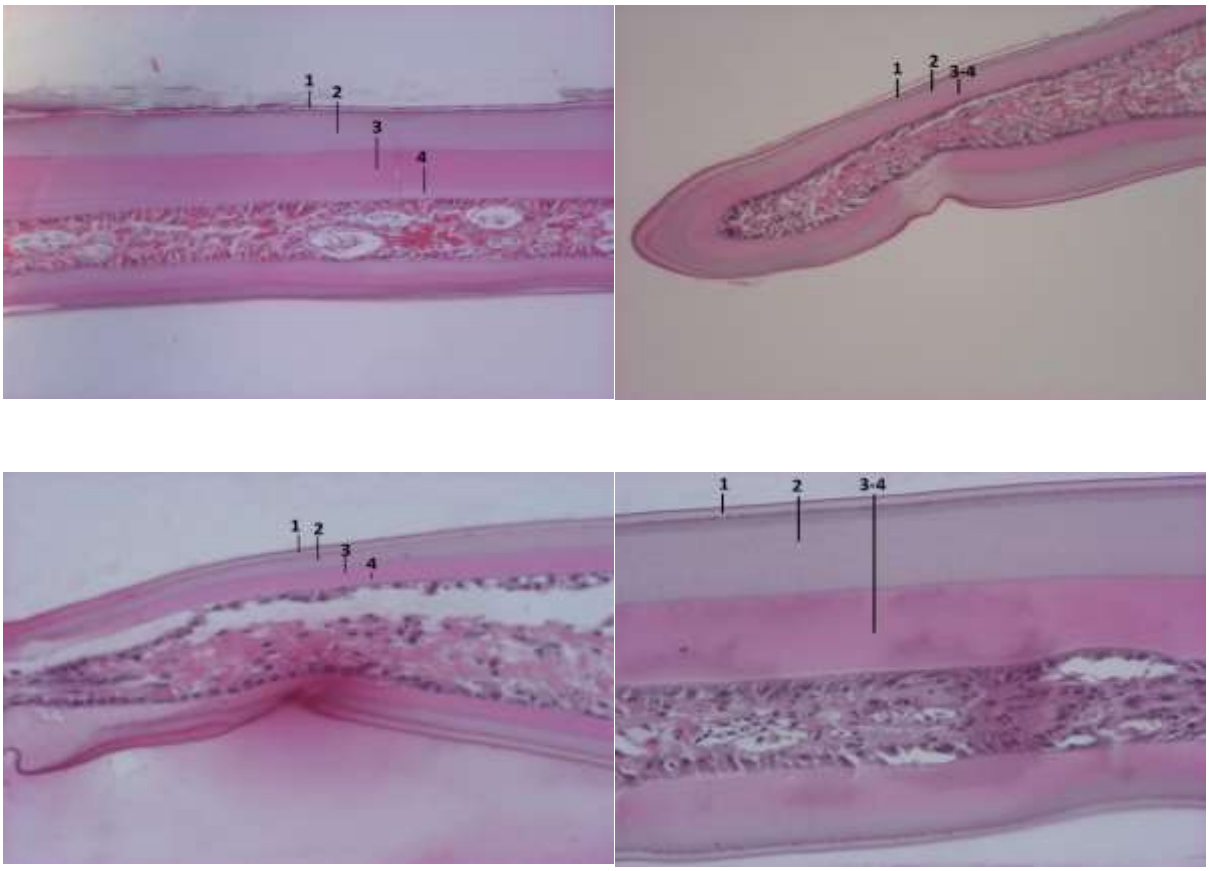


Figura 9. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio C del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-4: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula), 3 (endocutícula), 4 (capa membranosa). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio D0

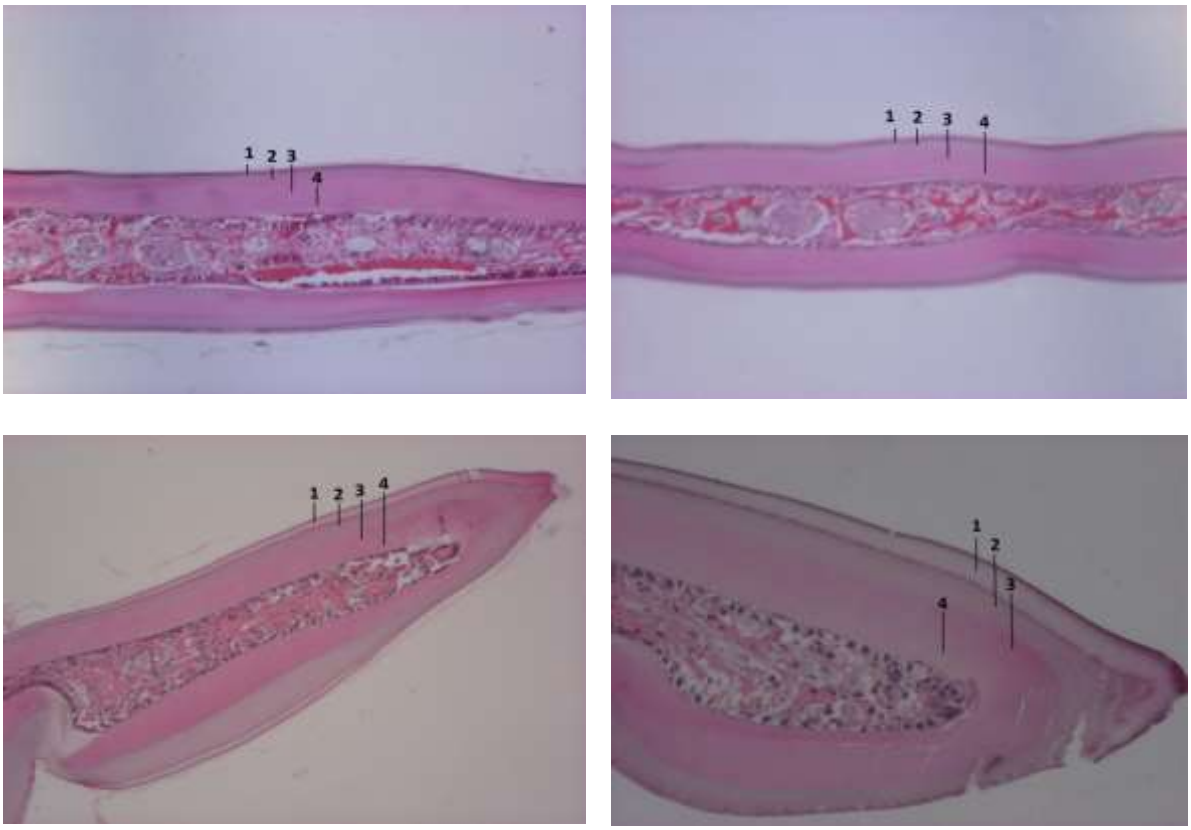


Figura 10. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D0 del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-4: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula), 3 (endocutícula), 4 (capa membranosa). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio D1

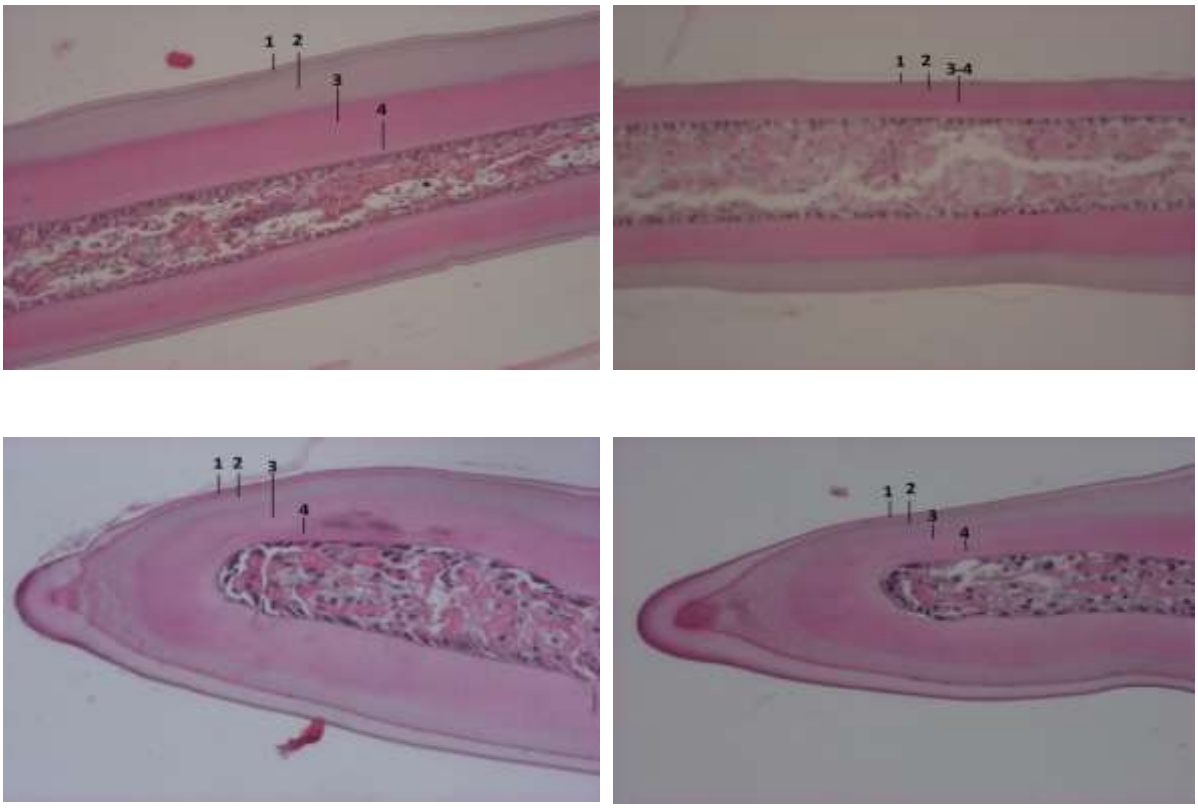


Figura 11. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D1 del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-4: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula), 3 (endocutícula), 4 (capa membranosa). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio D2

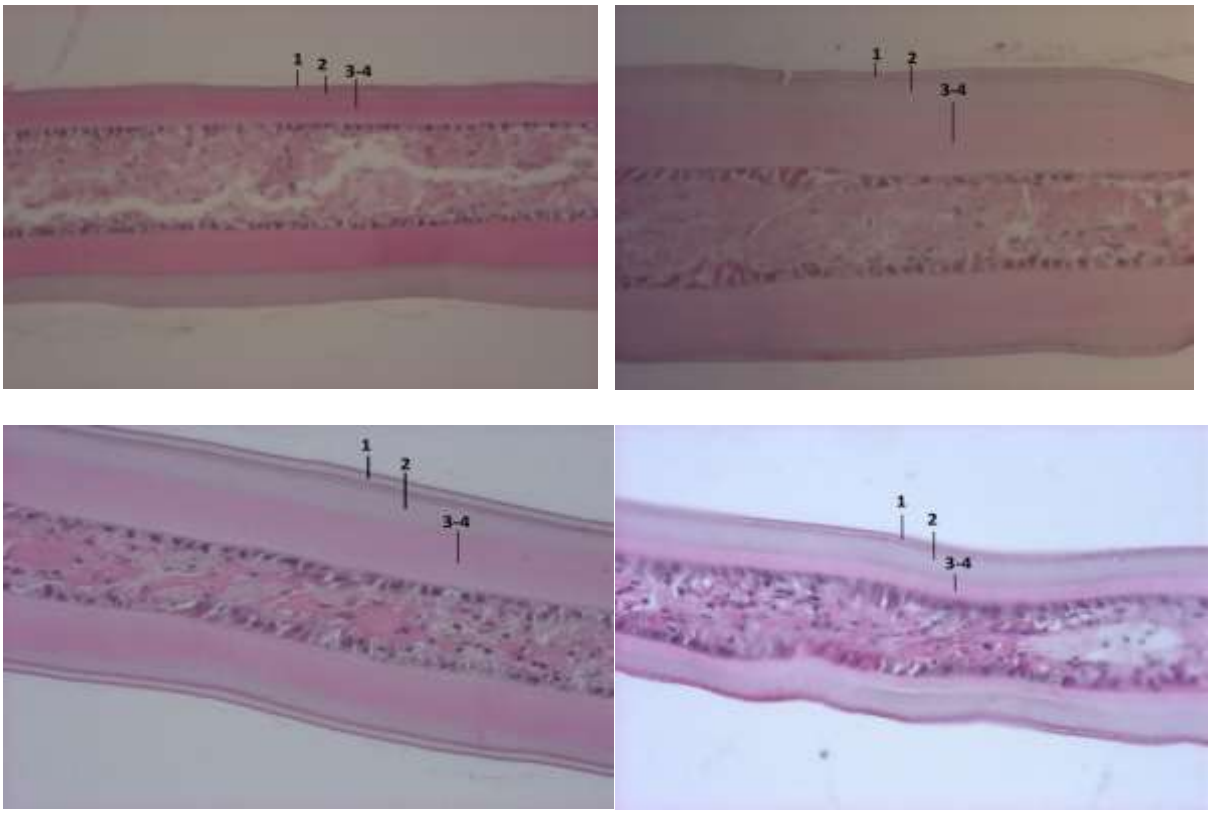


Figura 12. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D2 del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-4: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula), 3 (endocutícula), 4 (capa membranosa). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio D3

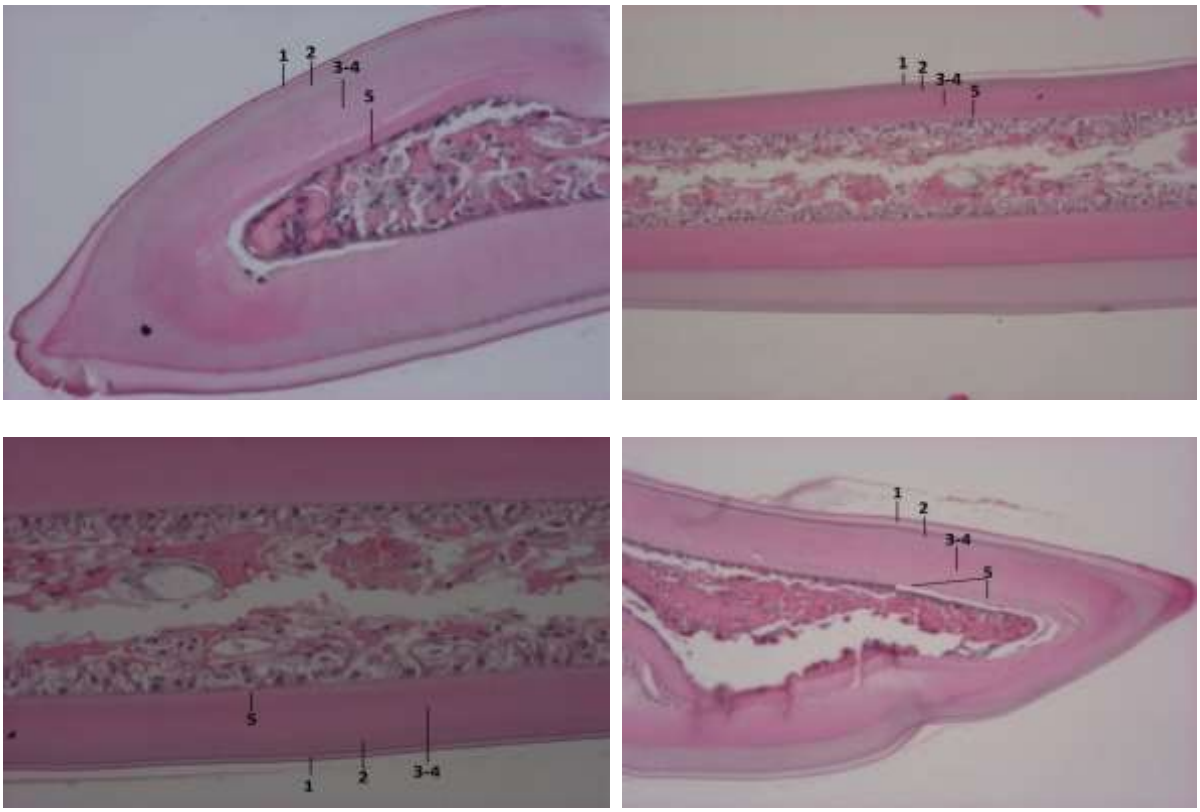


Figura 13. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D3 del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-5: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula, 3 (endocutícula), 4 (capa membranosa), 5 (nueva epicutícula). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio D4

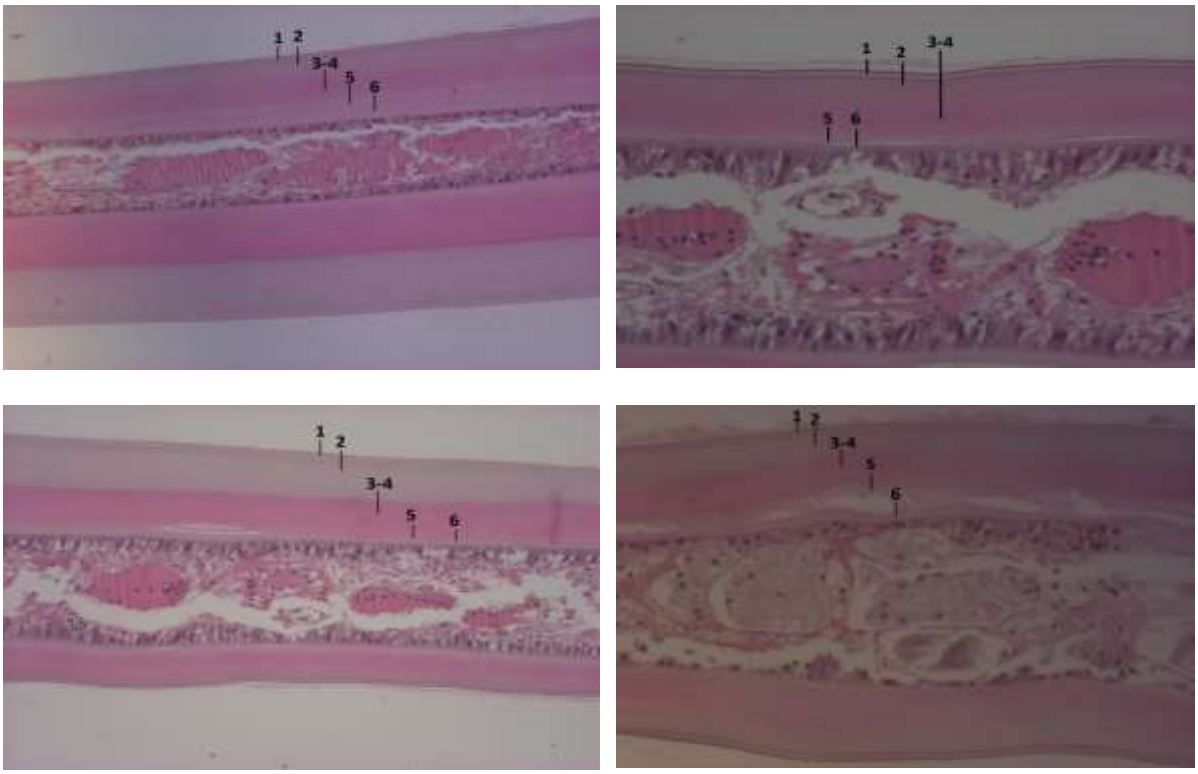


Figura 14. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio D4 del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-6: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula, 3 (endocutícula), 4 (capa membranosa), 5 (nueva epicutícula) y 6 (nueva exocutícula). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio E

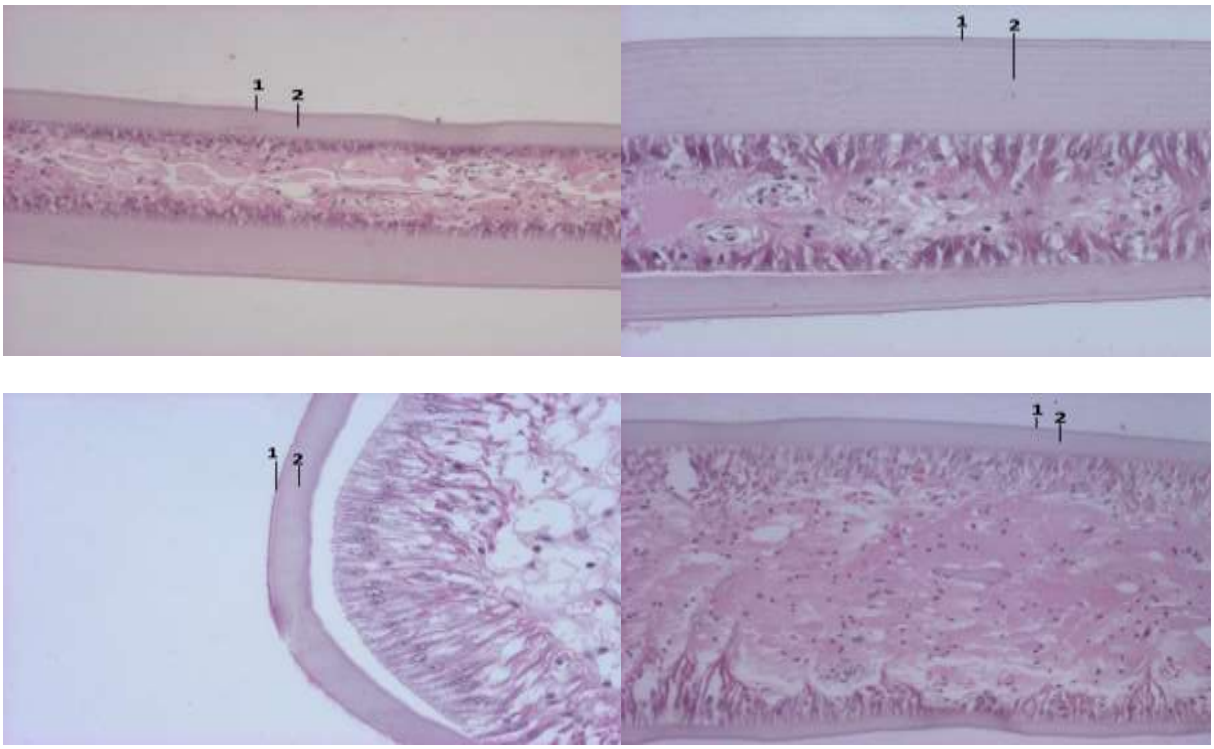


Figura 15. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón L*. vannamei* en el estadio D4 del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-2: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio A

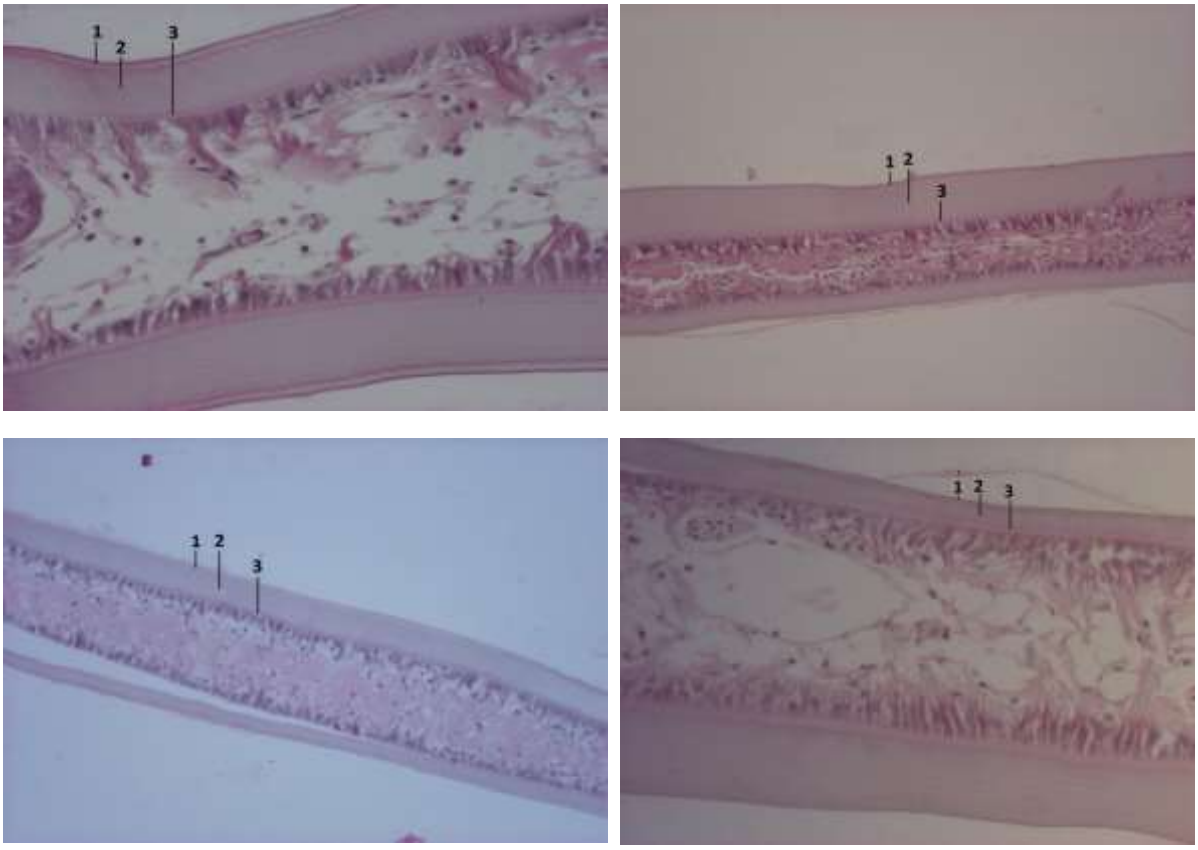


Figura 16. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio A del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-3: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula), 3 (endocutícula). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

Estadio B

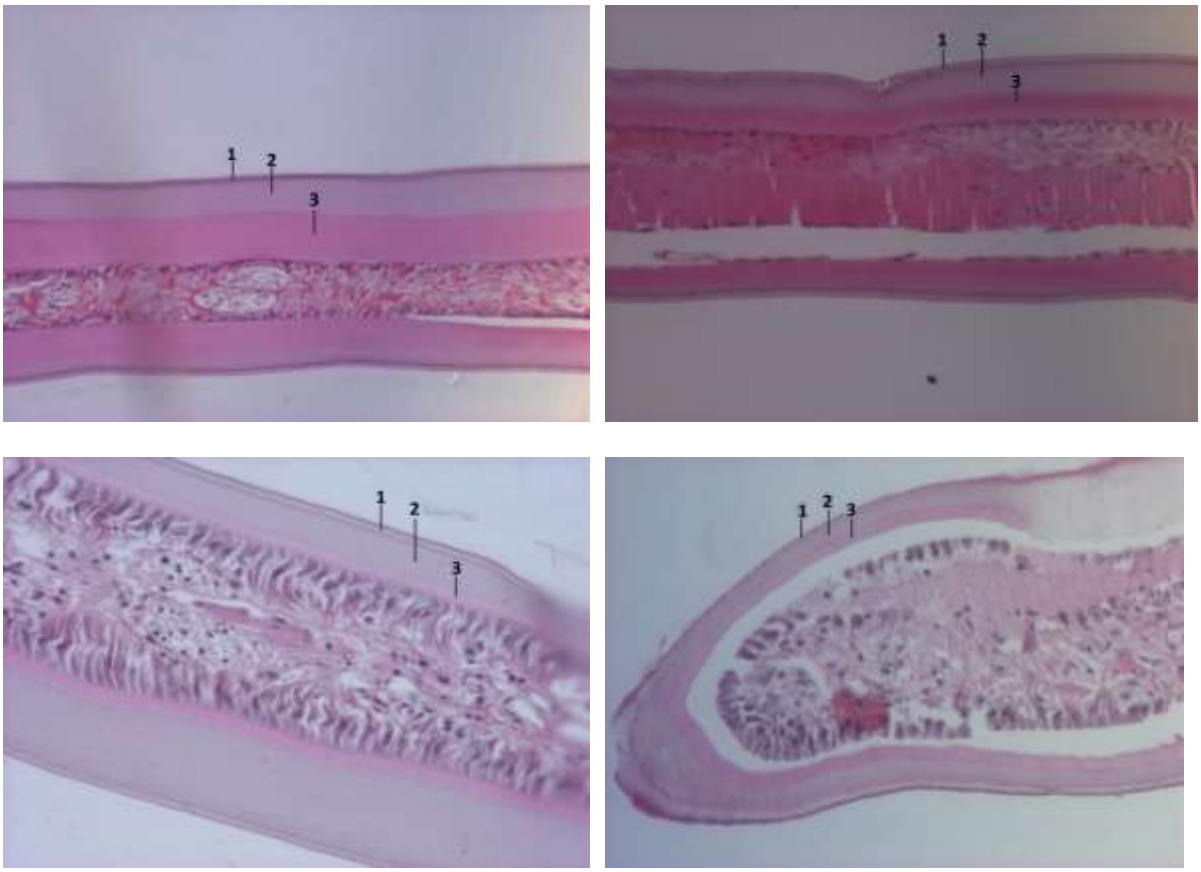


Figura 17. Cortes histológicos transversales de los urópodos, para observar las cutículas del camarón *L. vannamei* en el estadio B del ciclo de muda. Cada capa cuticular se indica con los números 1-3: 1 (epicutícula), 2 (exocutícula), 3 (endocutícula). Todas las figuras son con el mismo aumento (N=6).

7.2 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *Litopenaeus vannamei* en respuesta al estrés de cosecha

7.2.1 Contenido de nucleótidos

De los nucleótidos analizados, solamente los valores de IMP en el músculo abdominal en el tiempo cero presentaron valores significativamente más elevados ($P<0.01$), en los camarones del grupo control con valores de 0.23±0.06 µmol g^{-1} en comparación con los organismos estresados 0.07±0.01 µmol g^{-1} (Tabla VIII). Las concentraciones de ATP, ADP, AMP, NAT (nucleótidos adenílicos totales), CEA, Hx y ArgP (arginin fosfato) no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla VIII. Niveles de nucleótidos en camarones capturados en estanques con atarraya e inmediatamente congelados (Control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (Estrés). (N = 10 para cada grupo).

	Control	Estrés
ArgP	2.40 ± 0.37	2.20 ± 0.39
CEA	0.90 ± 0.03	0.80 ± 0.04
ATP	8.2 ± 0.3	7.7 ± 0.5
ADP	2.43 ± 0.2	2.80 ± 0.2
AMP	0.24 ± 0.05	0.40 ± 0.10
NAT	10.4 ± 0.4	11.0 ± 0.5
IMP	0.23 ± 0.06	0.07 ± 0.01*
Hx	0.02 ± 0.005	0.01 ± 0.004

Los datos se presentan como µmol g^{-1} en peso húmedo. Arg - P (fosfato de arginina); CEA (carga de energética adenílica); ATP (adenosín trifosfato); ADP (adenosín difosfato); AMP (adenosín monofosfato); NAT (nucleótidos adenílicos totales), IMP (inosín monofosfato); Hx (hipoxantina). * $P<0.01$, grupo estrés por emersión vs. grupo control.

Durante el transcurso del almacenamiento *post mortem*, el cambio en los niveles del ATP y compuestos relacionados fue muy similar entre los dos grupos, sin mostrar diferencias significativas por efecto de la captura en cada punto del tiempo que se realizó la comparación excepto para Hx (ver más adelante). Como ya se ha mencionado, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de ArgP, ATP y CEA en músculo de camarón por efecto del proceso de emersión en el tiempo cero, mientras que después

de 12 h de almacenamiento *post mortem* el ArgP ya no fue detectado, resultados no mostrados, y el ATP se vio reducido drásticamente ($P<0.05$, Fig. 18a). La CEA disminuyo significativamente ($P<0.05$), por debajo de 0.1 durante el período analizado (Fig. 19b). El ADP presentó una concentración inicial de 2.8 µmol g^{-1} (media global, independientemente de la emersión *ante mortem*), reduciéndose significativamente ($P<0.05$) a 0.6 µmol g^{-1} al cabo de 12 horas (media global, independientemente de la emersión *ante mortem*) para posteriormente mostrar un ligero descenso continuo no significativo (Fig. 18b). La concentración de AMP no varió entre grupos y se incrementó 22 veces después de 12 h de almacenamiento (Fig. 18c), presentando valores de 7.02 µmol g^{-1} (media global, independientemente de la emersión *ante mortem*), para después verse reducida paulatinamente. La concentración de nucleótidos adenílicos totales disminuyó significativamente a lo largo del tiempo de almacenamiento, de 10.7 µmol g^{-1} al momento del sacrificio a 2.4 µmol g^{-1} a las 144 h *post mortem*, con una con una reducción de 3.5 µmol g^{-1} en las primeras 12 h, para después mantener en promedio una reducción de 0.7 µmol g^{-1} por día.

La concentración (media globales, independientemente de la emersión *ante mortem*) de IMP incrementó significativamente de 0.15 µmolg^{-1} a partir de las 12 h de almacenamiento, hasta alcanzar las mayores concentraciones a las 72 y 96 h con 4.8±0.2 y 4.7±0.3 µmol g^{-1} en organismos sometidos a estrés por emersión y no estresados respectivamente, para posteriormente disminuir no significativamente, hasta 3.57 µmol g^{-1} a las 144 h (Fig. 20a). La Hx presentó el valor inicial más bajo de los productos de degradación del ATP con 0.02 µmol g^{-1} (media global, ambos grupos) y aumentó significativamente durante el almacenamiento en hielo, observándose una interacción significativa que indica un mayor aumento en el grupo de estrés por emersión a partir de las 96 h, alcanzando 0.6±0.03 µmol g^{-1}, comparado con 0.53±0.01 µmol g^{-1} en el grupo control a las 144 h (Fig. 20b).

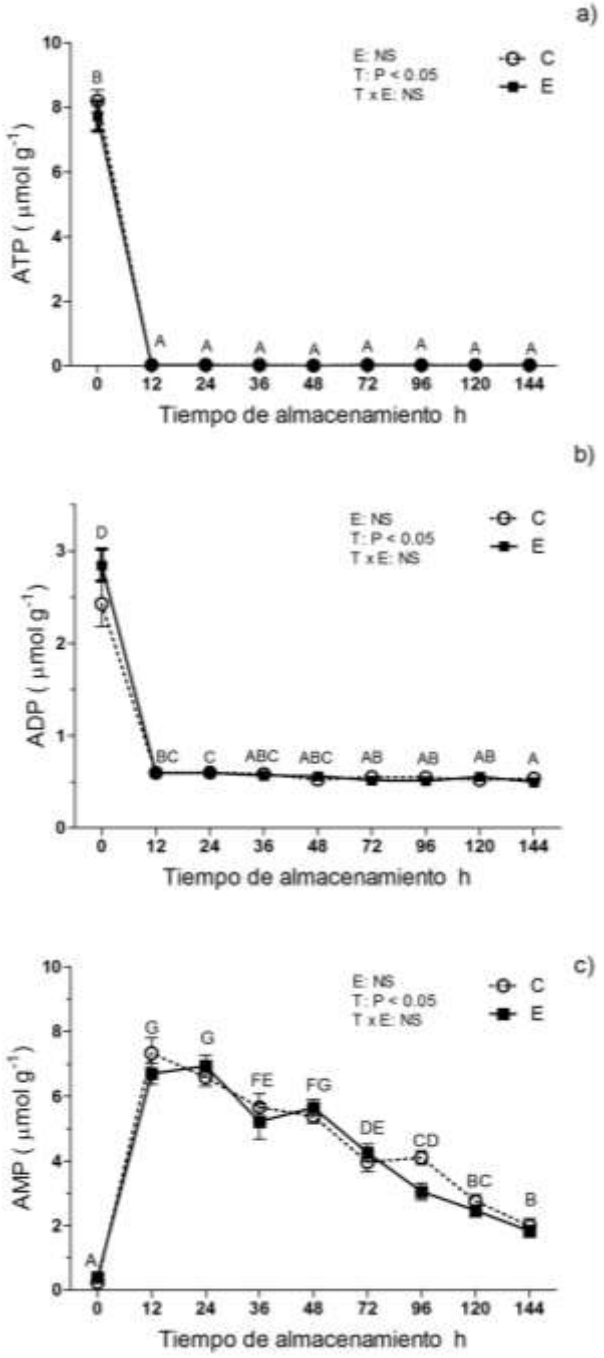


Figura 18. Cambios en las concentraciones de (a) ATP (adenosín trifosfato), (b) ADP (adenosín difosfato) y (c) AMP (adenosín monofosfato), en el músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: estrés). En la figura se insertan los resultados del ANOVA de dos vías (P<0.05), (tiempo de almacenamiento: T × estrés

ante mortem: E). Cuando la interacción no fue significativa, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias globales para los tiempos de almacenamiento, independientemente del estrés *ante mortem*. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias individuales sólo cuando la interacción fue estadísticamente significativa. Los datos se presentan como media ± ES, n = 10 camarones para cada grupo (control y estrés) en cada punto en el tiempo de almacenamiento.

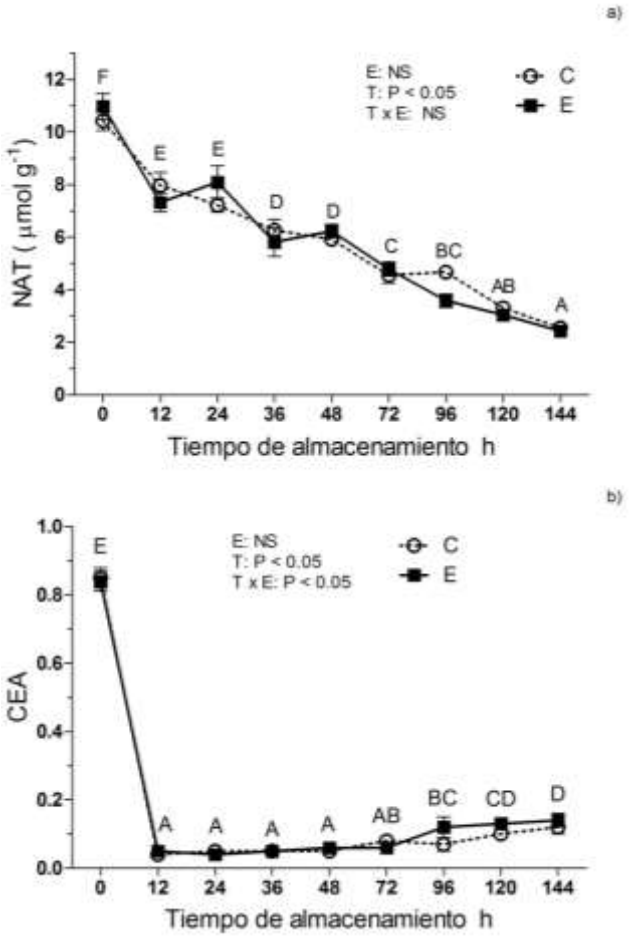


Figura 19. Cambios en las concentraciones de (a) NAT (Nucleótidos adenílicos totales) y (b) CEA (Carga energética adenílica), en el músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés). N = 10 para cada grupo. Ver figura 18 para análisis estadístico.

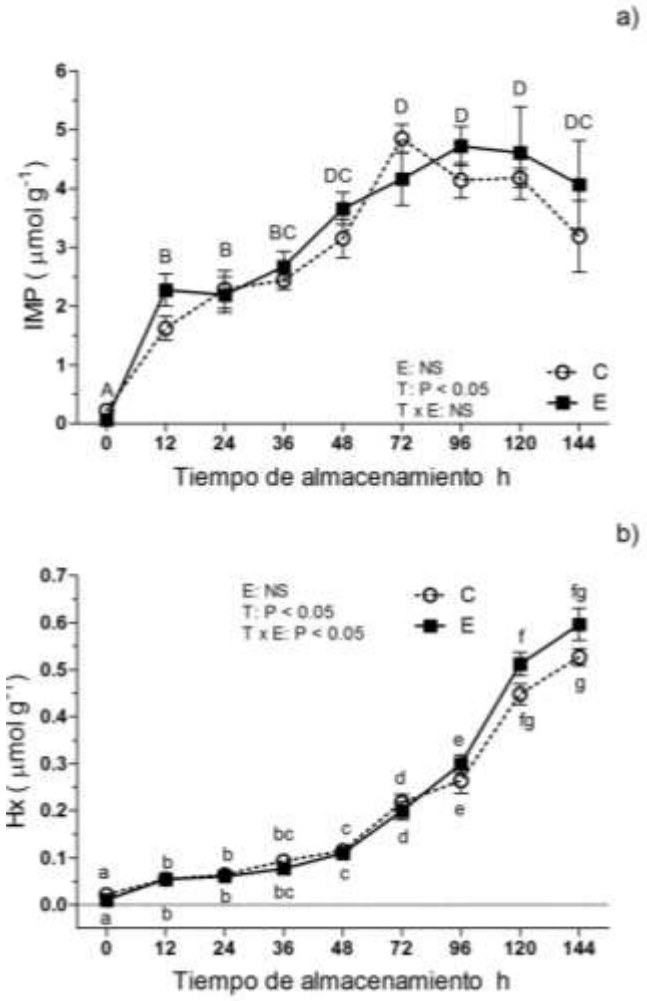


Figura 20. Cambios en las concentraciones de (a) IMP (inosín monofosfato) y (b) Hx (Hipoxantina), en el músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés). N = 10 para cada grupo. Ver figura 18 para análisis estadístico.

7.2.2 Análisis bioquímicos en músculo de camarón

Dentro de los análisis bioquímicos cuantificados, las proteínas totales presentaron diferencias significativas respecto al tiempo *post mortem*, observándose el valor más bajo a las 12 h, volviendo a incrementar a las 24 h manteniéndose sin cambios el tiempo de almacenamiento restante. El glucógeno y carbohidratos totales solo presentaron diferencias significativas respecto al tiempo *post mortem*, observándose los mayores

valores a las 24 y 36 h. El lactato en músculo de camarón mostro diferencias significativas por efecto del tiempo de almacenamiento, además de una interacción significativa a las 48 h *post mortem* con una mayor concentración en los organismos expuestos a estrés por emersión. Los lípidos totales no presentaron diferencias significativas (Tabla IX).

7.2.3 Valoración de pH

El músculo de camarón con 12 h *post mortem* presentó un pH de 6.2 (media global, independientemente de la emersión *ante mortem*), presentándose un incremento significativo conforme pasa el tiempo de almacenamiento, llegando a los valores máximos de 6.7 al cabo de 144 h (Fig. 21).

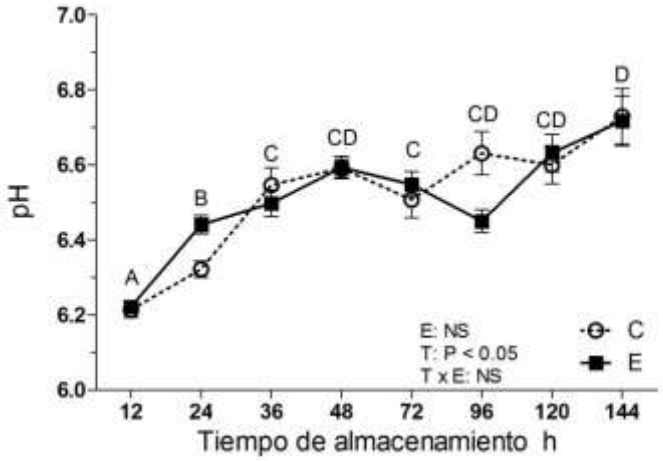


Figura 21. Cambio en la concentración de pH, en el músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés). N= 9 para cada grupo. Ver figura 18 para análisis estadístico.

Tabla IX. Variables metabólicas cuantificadas en músculo de camarón blanco *Litopenaeus vannemei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés).

TIEMPO/ CONDICIÓN		0	12	24	36	48	72	96	120	144	E	T	ExT
CHO mg g^{-1}	C	$27±1.7^{A}$	$40±3.1^{CB}$	$46±2.5^{C}$	$47±2.9^{C}$	$49±1.7^{C}$	$37±3.0^{CB}$	$36±2.1^{CB}$	$32±1.5^{BA}$	$24±4.2^{A}$	NS	*	NS
	E	28±1.1	41±4.2	47±4.2	48±4.5	43±3.4	44±3.0	43±2.6	34±4.5	28±6.3			
GCG mg g^{-1}	C	$10±1.5^{AB}$	$13±2.0^{ABC}$	$15±3.0^{C}$	$15±1.9^{BC}$	$13±0.6^{ABC}$	$10±1.2^{ABC}$	$12±1.3^{BC}$	$11±0.5^{AB}$	$7±0.7^{A}$	NS	*	NS
	E	10±2.3	13±1.4	16±2.0	14±1.9	12±1.6	12±1.4	16±0.9	9±1.0	9±2.5			
PT mg g^{-1}	C	$545±34^{B}$	$454±18^{A}$	$550±31^{AB}$	$484±32^{AB}$	$544±34^{AB}$	$497±25^{AB}$	$522±18^{AB}$	$474±27^{AB}$	$506±34^{AB}$	NS	*	NS
	E	591±33	439±28	530±41	529±43	436±26	506±18	561±36	516±39	521±22			
LT mg g^{-1}	C	26±1.7	25±1.6	26±4	29±2.9	27±1.9	26±3.2	26±2.0	28±2.4	21±1.8	NS	NS	NS
	E	27±2.7	25±2.5	26±1	25±2.4	24±3.6	27±3.0	28±3.3	22±2.3	21±1.2			
LAC mg g^{-1}	C	$8±0.8^{abcd}$	$7±0.4^{ab}$	$10±0.5^{abcde}$	$11±0.6^{bcde}$	$9±1.4^{abcde}$	$8±1.5^{abcde}$	$12±0.5^{cde}$	$11±0.5^{bcde}$	$10±0.3^{abcde}$	NS	*	*
	E	$6±0.4^{a}$	$8±0.5^{abcd}$	$10±0.5^{abcde}$	$10±0.9^{abcde}$	$8±1.1^{abc}$	$12±0.6^{e}$	$12±0.7^{de}$	$10±1^{bcde}$	$9±1^{abcde}$			

En la tabla se insertan los resultados del ANOVA de dos vías ($P<0.05$), (tiempo de almacenamiento: T × estrés *ante mortem*: E). Cuando la interacción no fue significativa, diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las medias globales para los tiempos de almacenamiento, independientemente de la emersión *ante mortem*. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias individuales sólo cuando la interacción fue estadísticamente significativa. Los datos se presentan como media ± SE, n = 9. Carbohidratos totales (CHO), glucógeno (GCG), proteínas totales (PT), lípidos totales (LT) y lactato (LAC).

7.2.4 Color

Los parámetros de color de la parte interna y externa del músculo de camarón por efecto del proceso de cosecha y durante el almacenamiento de 144 h en hielo se muestran en las figuras 22 (parte extarna) y 23 (parte interna).

7.2.4.1 Parte externa

Los parámetros del color que se tomaron en la superficie del músculo abdominal se muestran en la figura 22. El valor de L* y el índice de blancura, no se vieron afectados por el tiempo *post mortem* ni por efecto del estrés (Fig. 22a). Sin embargo el músculo en camarones sometidos a estrés por emersión presenta valores significativamente ($P<0.05$) menores de a* -1.3±0.05 y b* -3.0±0.13 (media global para cada grupo para todos los puntos en el tiempo de almacenamiento), comparado con los valores del grupo control para a* -1.4±0.04 y b* -3.2±0.08 (Fig. 22b). En relación con el valor de a*, ambos grupos presentaron un comportamiento similar en el tiempo de almacenamiento, observándose un cambio en el valor inicial de a* con -1.4 (media global, independientemente de la emersión *ante mortem*), disminuyendo significativamente a un valor de -1.8 a las 24 h, para posteriormente incrementar a -1.3 a las 72 h y finalmente disminuir a -1.0 a las 144 h. El valor inicial de b* para los camarones control (media global para todos los tiempos: -3.2) fue significativamente menor que para los que fueron sometidos a estrés (-2.9); este efecto sólo se observó a partir de las 96 h, aunque la interacción no fue significativa. A lo largo del tiempo de almacenamiento se presentaron ciertas variaciones significativas con valores mayores a las 72 y 144 horas tal como se puede apreciar en la Fig. 22c. Para cromaticidad (C*), solamente se observó un efecto significativo del tiempo de almacenamiento con aumento de 3.4 (media global a las 12 h), a 3.9 a las 36 h, seguido de una disminución hasta llegar al valor de 2.6 a las 144 h (Fig. 22d). Para el ángulo de matiz (H°), se presentaron valores ligeramente, pero significativamente ($P<0.05$) más altos durante los tiempos *post mortem* de 96 y 120 h (Fig. 22e).

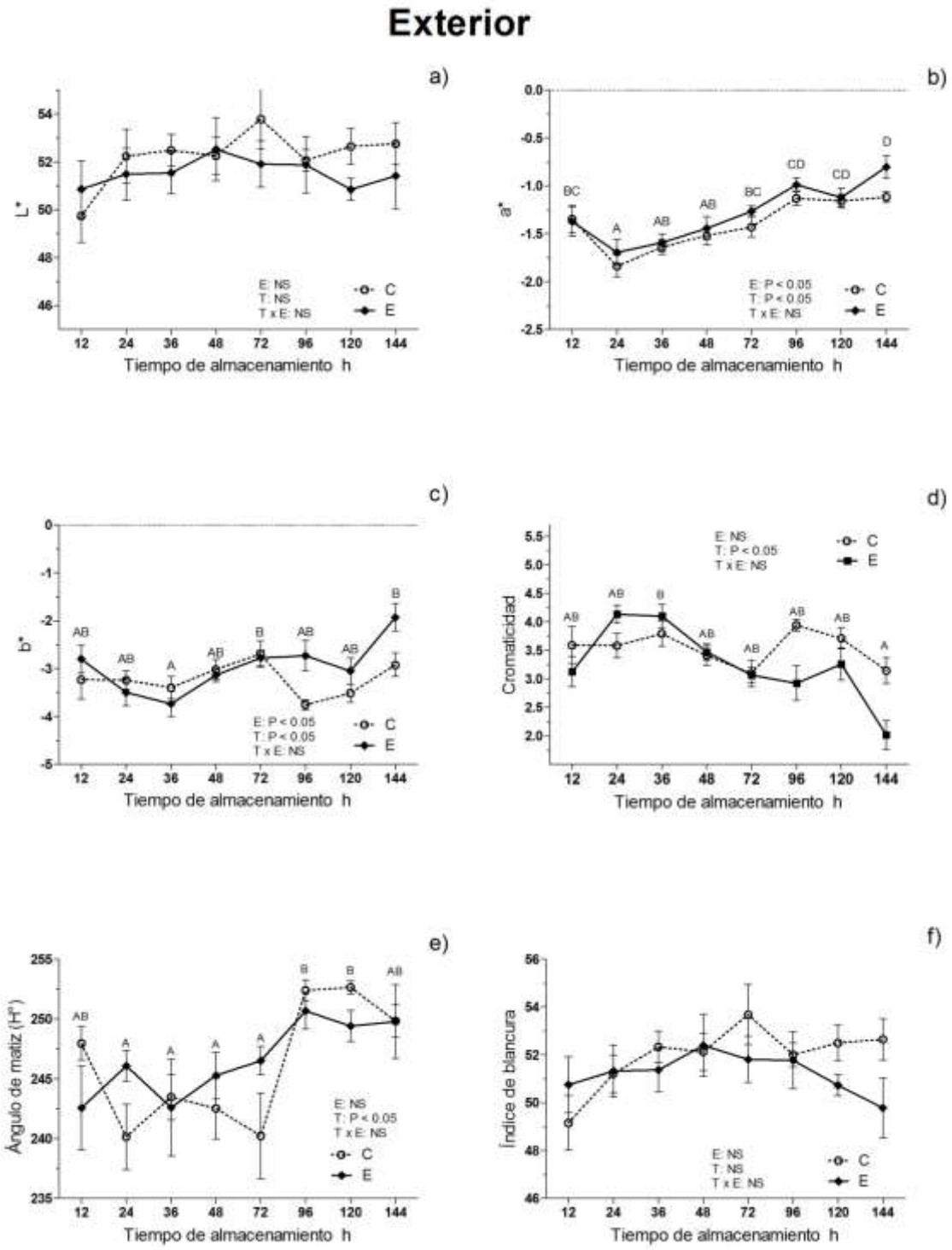


Figura 22. Cambios en las variables de color: (a) L*(luminosidad), (b) a*(matiz rojo-verde), (c) b* (matiz amarillo-azul), (d) Cromaticidad, (e) Ángulo de matiz y (f) Índice de blancura,

en la parte exterior del músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés). N=9 para cada grupo. Ver figura 18 para análisis estadísticos.

7.2.4.2 Parte interna

Los parámetros de color interno del músculo abdominal se muestran en la figura 23. El valor de L* no presentó diferencias por efecto del estrés, pero si se observó un incremento significativo a lo largo del tiempo, a las 36 h, 72 h, y de nuevo a las 144 h con respecto a las 12 h, siendo los valores inicial y final de 41.0 y 50.7 (media global) a las 12 y 144 h respectivamente (Fig. 23a). El valor de a* solo se vio afectado significativamente por efecto del estrés, con un valor de -0.8±0.06 para los camarones del grupo control y un valor de -0.6±0.05 para los camarones sometidos a estrés por emersión (media global para cada grupo y para todos los puntos en el tiempo de almacenamiento) (Fig. 23b). El valor de b* no presentó diferencias por efecto del estrés, pero si presentó una disminución significativa ($P<0.05$) a las 72 h de -0.71 (media global) con respecto a las 12 h con un valor de 0.56 y 144 h con un valor de 0.59 (media global, independientemente de la emersión *ante mortem*) (Fig. 23c). El valor de C* no cambió con el tiempo y no fue diferente entre los grupos estrés y control. En la sección interna, H ° fue más variable que en la parte externa y se observó una influencia significativa del tiempo de almacenamiento que dependió de la condición de estrés, tal como lo indicó una interacción significativa, para el grupo control, no se observaron diferencias significativas con el tiempo, mientras que en el grupo sometido a estrés por emersión, los valores más altos se observaron a las 36, 72 y 120 h con valores de 216, 217 y 204, respectivamente, en comparación con los valores más bajos a las 12 y 144 h (108.8 y 108.7) (Fig. 23d). El índice de blancura no fue afectado por el proceso de emersión, y un incremento significativo ($P<0.05$) en relación con el tiempo de almacenamiento fue observado (Fig. 23e).

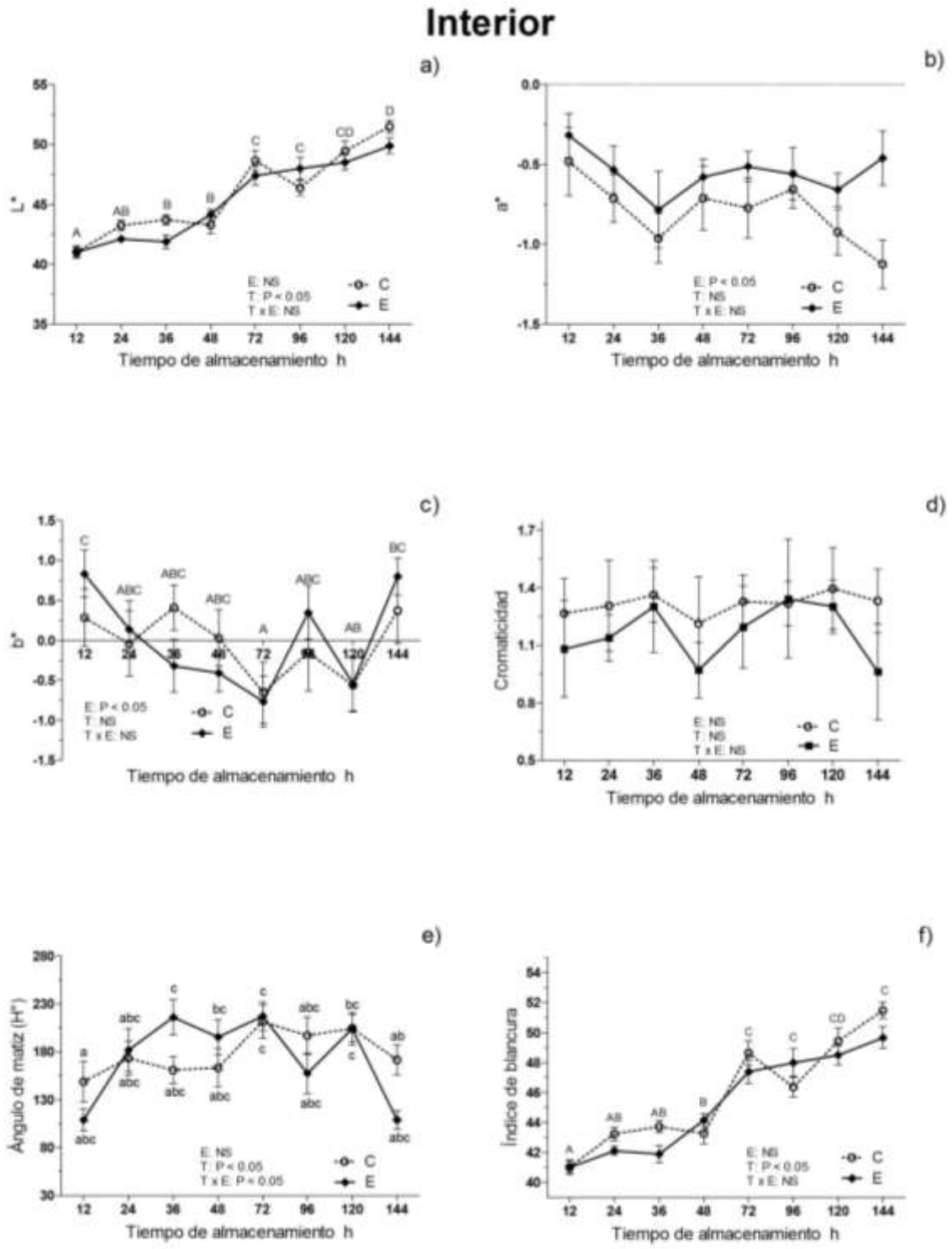


Figura 23. Cambios en las variables de color: (a) L* (luminosidad), (b) a* (matiz rojo-verde), (c) b* (matiz amarilo-azul), (d) Cromaticidad, (e) Ángulo de matiz y (f) Índice de blancura, en la parte interior del músculo abdominal de *L. vannamei* capturados a borde

del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés). N=9 para cada grupo. Ver figura 18 para análisis estadístico.

7.2.5 Análisis de perfil de textura (APT) y agua expresable

El agua expresable aumentó significativamente (P<0.05) en un 1.2% a las 144 h, en comparación con las 12 h, con un pico pronunciado a las 72 h (Fig. 24a). Se observó un efecto significativo (P<0.05) del tiempo de almacenamiento sobre la dureza y, aunque la interacción no fue significativa, este efecto fue evidente sólo para el grupo control con valores máximos de 0.62±0.06 kgf a las 24 h y mínimos de 0.28±0.03 kgf a las 120 h (Fig. 24b).

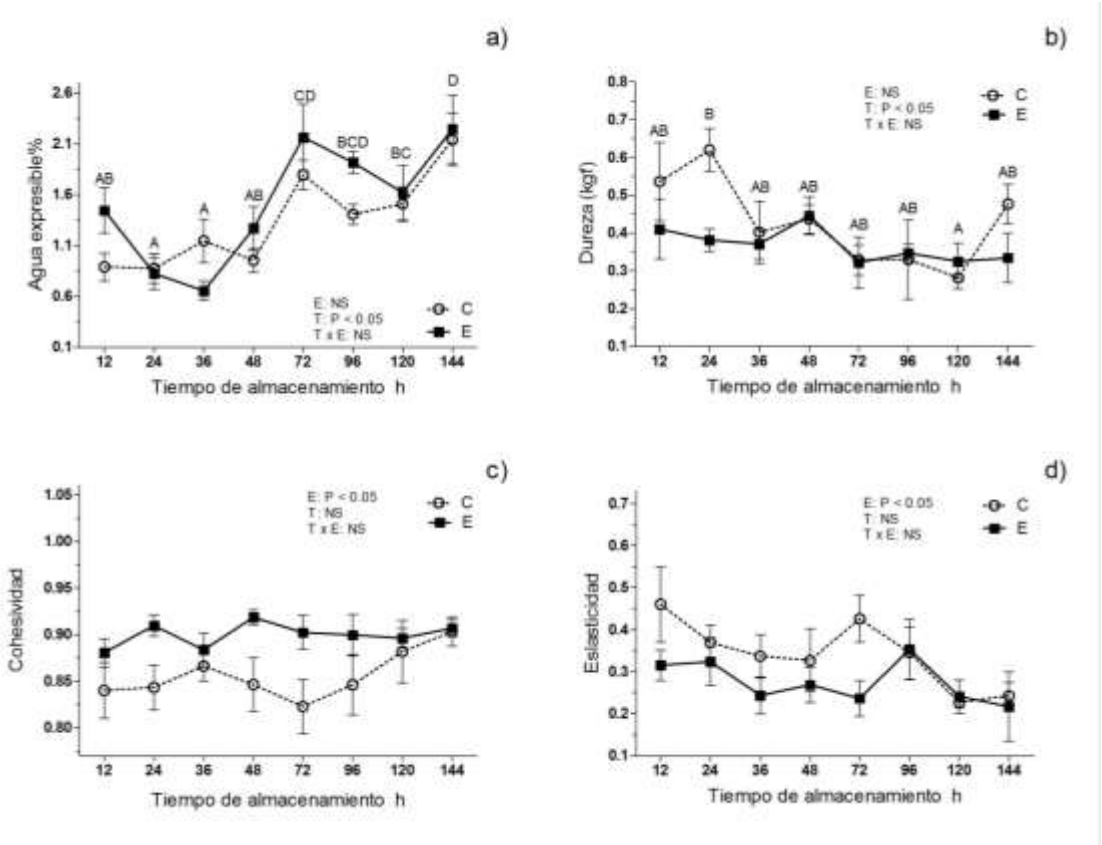


Figura 24. Cambios en las variables del análisis del perfil de textura en músculo de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés). n= 6 para cada grupo. Ver figura 18 para análisis estadístico.

La cohesividad (Fig. 24c) y la elasticidad (Fig. 24d) sólo se vieron afectadas por el estrés *ante mortem*, pero no por el almacenamiento en hielo, con valores significativamente más bajos en camarones estresados en un 21% para elasticidad y en un 4% mayores para cohesividad.

7.2.6 Peroxidación lipídica

Se observó un mayor contenido de LOOH para camarones sometidos a estrés, aunque las diferencias significativas entre ambos grupos sólo se observaron a las 12 h (control: 0.31; estrés: 1.37 µg/g) y al final del período de almacenamiento (control: 1.14; estrés 2.22 µg/g), tal como se aprecia por una interacción significativa (Fig. 25).

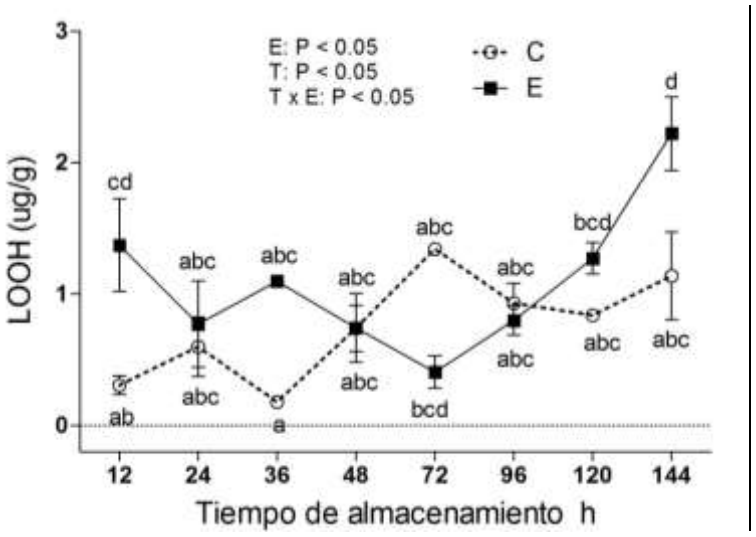


Figura 25. Cambios en las concentraciones de LOOH en músculo de *L. vannamei* capturados a borde del estanque con una atarraya y congelados inmediatamente (C: control) y camarones sometidos a prácticas comunes de cosecha que implican emersión y confinamiento durante 15 minutos (E: Estrés). En la figura se insertan los resultados del ANOVA de dos vías (P<0.05), (tiempo de almacenamiento: T × estrés *ante mortem*: E). n= 6 para cada grupo. Ver figura 18 para análisis estadístico.

8. DISCUSIÓN

8.1 Análisis Bioquímicos durante el ciclo de muda

Como todos los organismos, los crustáceos deben mantener una homeostasis energética y para ello utilizan como combustible los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas en sus diferentes formas de almacenamiento (Jimenez y Kinsey, 2015). De los diferentes componentes bioquímicos analizados, el glucógeno en hepatopáncreas fue el único que presentó diferencias significativas, con una marcada disminución en la muda misma y una pronta recuperación en la postmuda temprana (tabla VI). Passano (1960) menciona que la falta de glucosa observada desde los estadios de premuda, es nivelada a través de las reservas de glucógeno que existen en el hepatopáncreas. La disminución de glucógeno inmediatamente después de la ecdisis ya ha sido reportada en *L. vannamei*, (Galindo *et al*., 2009) y en la etapa de postmuda (estadio A y B1) en *Eriocheir sinensis* y *Farfantapenaeus duorarum* (Gómez *et al*., 2012; Tian *et al*., 2012). Asimismo, la disminución del glucógeno durante el ciclo de muda se ha relacionado como la fuente de glucosa para la síntesis de N-acetilglucosamina, que es el oligómero de la quitina (Passano, 1960; Gwinn y Stevenson, 1973; Cuzon *et al*., 2000), además de utilizarse para satisfacer las necesidades energéticas durante la síntesis y elaboración de constituyentes orgánicos de la cutícula (Travls, 1957; Parvathy, 1971). Baumberger y Olmsted (1928), indican que el desglose de glucógeno a la glucosa en la etapa de premuda en cangrejos contribuye a un aumento en la presión osmótica de la hemolinfa. Por otro lado, es claro que además de la demanda energética que implican los procesos de síntesis, existe un costo energético asociado al proceso de osmorregulación (Galindo *et al*., 2009) que es mayor en condiciones hiposmóticas que isosmóticas (Cheng *et al*., 2002). La recuperación del glucógeno durante la postmuda 12-24 h posterior a la ecdisis (estadio A) se debe posiblemente a que el organismo ya está ingiriendo alimento (Galindo *et al*., 2009) o bien a un incremento en la gluconeogénesis (ver sección 8.1.1).

A nivel de tejidos, la glucosa se metaboliza por vía anaerobia hasta lactato lo cual es una respuesta común en muchas situaciones de estrés (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández, 2000; Pérez-Rostro, 2004; Mercier *et al*., 2006; Aparicio-Simón *et al*., 2010). La activación del metabolismo anaerobio es particularmente importante en el camarón en condiciones de hipoxia ambiental (Racotta *et al*., 2002; Mugnier *et al*., 2008) o funcional (Racotta y Palacios, 1998; Aparicio-Simón *et al*., 2010) que se da por actividad muscular intensa como lo es la respuesta de escape del camarón. En el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de lactato muscular pese a que hubo una disminución del glucógeno en el hepatopáncreas; esto puede ser debido a que el lactato es enviado rápidamente a hemolinfa como una estrategia para incrementar la afinidad del oxígeno por la hemolinfa (Truchot, 1980; Booth *et al*., 1982; Bridges, 2001). En relación a esto, se ha sugerido que los camarones peneidos son muy eficientes para la eliminación del lactato muscular hacía hemolinfa, seguido de depuración por gluconeogénesis (Yu *et al*., 2009; Aparicio-Simón *et al*., 2010). Desafortunadamente, en el presente trabajo no se analizó la concentración de lactato en hemolinfa debido a que este muestreo representa un estrés adicional para el organismo que puede afectar los niveles de nucleótidos (Robles-Romo, 2014).

La síntesis y degradación de las proteínas musculares determina la tasa de crecimiento del camarón, la cual se modula con cada ciclo de muda (Whiteley y El Haj, 1997; Cesar y Yang, 2007). En el presente trabajo el contenido de proteína en músculo abdominal y hepatopáncreas no presentaron variaciones significativas en el ciclo de muda de *L. vannamei*. Un comportamiento similar fue reportado para juveniles de *L. vannamei* (Cesar *et al*., 2006) y en el músculo abdominal de *L. vannamei* durante el ciclo de muda (Cesar *et al*., 2006; César y Yang, 2007).

El colesterol por su parte es muy importante en los crustáceos porque es un constituyente de la membrana celular, estructuras sub-celulares y precursor de hormonas esteroides como la ecdisona, además representa un nutriente esencial en crustáceos dado

que no lo pueden sintetizar (Teshima, 1972). En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de colesterol en músculo o hepatopáncreas. Sin embargo, en *Farfantepenaeus duorarum* reportan una disminución en las concentraciones de colesterol en la hemolinfa antes de la ecdisis, mientras que en el hepatopáncreas reportan concentraciones más altas antes de la ecdisis (Bonilla *et al*., 2012).

8.1.1 Metabolismo energético en los diferentes estadios del ciclo de muda

En músculo se observó una carga energética adenílica considerada como óptima en todos los estadios del ciclo de muda con un promedio de 0.79 (Atkinson, 1968), presentándose diferencias significativas entre los estadios C, D0, D1, D2 y D3 con un promedio general más bajo (0.76) con respecto al estadio E con un valor de 0.89, mientras que los estadios A, B y D4 presentaron niveles intermedios entre 0.78 y 0.83. Para ArgP, de manera similar a la CEA, los valores más altos también se observaron en los estadios E y A.

Este tipo de comportamiento en la CEA ya ha sido reportado en otras especies como *Macrobrachium nipponense,* donde los valores de CEA en músculo abdominal en premuda tardía fueron de 0.88 y en el estadio A de 0.89, siendo los más altos comparado con otros estadios del ciclo de muda, como el de intermuda con el valor más bajo (0.68). Dichos cambios se asocian con un aumento en la actividad metabólica del organismo conforme la ecdisis se acerca, mientras que en postmuda pueden ser indicativos de la recuperación de la actividad metabólica general asociada con la ecdisis (Wang *et al*., 2003). De manera similar, en *Homarus americanus* tampoco se presentaron diferencias significativas para la CEA entre los estadios de premuda, intermuda y postmuda, con valores de 0.95, 0.91 y 0.94 respectivamente (Dehn *et al*., 1985); Los autores mencionan que si bien no hubo cambios, existen alteraciones en el metabolismo energético durante el ciclo de muda los cuales pueden ser correlacionados con cambios en la actividad del organismo y se pueden observar de mejor manera en la relación ATP/ADP que se

incrementó antes y después de la ecdisis, lo que indica producción de energía. Asimismo, se observó un incremento de ArgP en postmuda respecto a intermuda y premuda con valores de 18.3, 9.5 y 9.5 $\mu molg^{-1}$ respectivamente, lo cual fue atribuido a una recuperación asociado con un aumento en la actividad del organismo durante la ecdisis (Dehn *et al*., 1985).

Así, observamos que durante este estrés endógeno, parece existir una sobreproducción de energía durante etapas criticas como se observa en los estadios A y E, siendo necesaria esta energía en múltiples funciones fisiológicas así como en el rompimiento y liberación del exoesqueleto que a través de movimientos bruscos y una serie de flexiones que duran un aproximado de 1-2 min logra su desprendimiento y que son similares a la respuesta de escape. Dicha respuesta ha sido caracterizada en *L. vannamei* en el cual después de 25 s de persecución y un aproximado de 26 a 29 flexiones se llega al agotamiento del organismo y se presenta una disminución del 18% para la CEA y del 75% para la ArgP con respecto al grupo control (Robles *et al*., 2016). Por lo tanto, esperábamos que estas variables también disminuyeran al menos durante la ecdisis, por la actividad muscular involucrada en la cual los requerimientos de energía exceden la capacidad aeróbica y la contracción muchas veces se vuelve dependiente del metabolismo anaeróbico.

Se ha reportado para *L. vannamei* un incremento de hemocianina (transportador de oxígeno y otros metabolitos) en hemolinfa durante premuda tardía (Galindo *et al*., 2009; Cheng *et al*., 2002). Este incremento se relaciona con una disminución en la permeabilidad del tegumento, lo que permite al organismo la ingesta de agua para aumentar el volumen del cuerpo a finales de premuda y postmuda temprana. Esto trae como consecuencia una variación en la capacidad osmótica que según Galindo *et al*. (2009) es una adaptación única del ciclo de muda, y la regulación de los niveles de glucosa y hemocianina contribuyen al mantenimiento de la homeostasis interna en el camarón durante esta etapa crítica. Aunado a este incremento de hemocianina a finales de

premuda *L. vannamei* podría estar presentando un incremento en su tasa de respiración en estos mismos estadios, ya que se ha documentado un incremento en la tasa de respiración en el camarón *Xiphopenaeus kroyeri* durante finales de premuda y hasta en 40% después de 3 h de la ecdisis (Carvalho y Phan, 1998). Resultados similares han sido reportados para el langostino *Palaemon pacificus* (Emmerson, 1985) y el camarón *Crangon vulgaris* (Hagerman, 1976). El aumento de la respiración antes y después de la ecdisis se explica por una mayor permeabilidad al agua que conduce a más trabajo en la regulación del medio interno del animal. Este incremento del metabolismo explicaría el incremento de ATP como de su reserva inmediata la ArgP, así como de las variables que dependen de la concentración de ATP como la CEA y la relación ATP/ADP. Sin embargo, esto debió de haberse acompañado con una utilización generalizada de reservas del camarón que en principio debió ser reflejada en la disminución de las mismas. Lo anterior solo fue el caso para glucógeno del hepatopáncreas más no para otras reservas como la proteína muscular o los lípidos del hepatopáncreas, tal como ya se discutió. No puede descartarse otras reservas como las proteínas, los lípidos y la glucosa circulantes.

Por otro lado, el incremento de ATP disponible, como de ArgP como reserva inmediata de ATP, puede ser una estrategia de *L. vannamei* para evitar posibles depredadores o canibalismo, porque durante estos estadios (E y A) el camarón se encuentra sin protección del exoesqueleto y depende exclusivamente de la respuesta de escape para evitar circunstancias peligrosas. Según Domenici *et al*. (2011), la respuesta de escape permite que un organismo se aleje de un posible depredador o de una situación peligrosa.

Hucul *et al*. (1985) mencionan que pequeños cambios de adenina en el equilibrio de los nucleótidos ejercen una influencia fisiológicamente relevante sobre las tasas de inicio en la síntesis de proteínas. En este sentido, se ha reportado que el incremento en la producción de energía disponible proporcionado por cambios en el equilibrio de los nucleótidos de adenina es necesario en las células musculares para la síntesis de proteínas

en *M. nipponense* y *Homarus americanus* (El Haj *et al*., 1996; Wang *et al*., 2003). En *L. vannamei* durante la premuda tardía, incrementa la proporción ARN/proteína y las actividades metabólicas que posiblemente estén relacionadas con el crecimiento muscular, como la síntesis de proteínas (Cesar *et al*., 2006). Sin embargo, en el presente trabajo el incremento de energía disponible se observó justo en el estadio de muda y postmuda, por lo cual es necesario investigar más fondo los momentos precisos de la síntesis de ARN y proteínas y la relación con la disponibilidad y el costo energético.

En cuanto a la variación de otros nucleótidos como los guanílicos, se sabe que el GTP (guanosín trifosfato) está involucrado en el primer paso de la gluconeogénesis de los componentes del ciclo del ácido cítrico y en la síntesis de proteínas (Derr y Zieve, 1972), eventos que podrían estar ocurriendo en relación al ciclo de muda, tal como ya se mencionó. En el presente trabajo se observó un incremento significativo del GTP, duplicando su concentración en el músculo inmediatamente después de la ecdisis e incrementando en un 60% durante el estadio A, respecto al estadio D4. De la misma manera se observó que GDP duplica su concentración inmediatamente después de la ecdisis e incrementa en 57% durante el estadio A, respecto al estadio D4. Durante la síntesis de proteínas se requiere de la hidrólisis de ATP y GTP (Walton y Gill, 1975). También es muy importante el GTP en la reacción de la adenilato ciclasa que controla la actividad mitótica de la célula (Moal *et al*., 1991).

En el presente trabajo la detección misma de IMP e hipoxantina y los incrementos observados son hasta cierto punto inesperados dado que se trata de productos de degradación de nucleótidos adenílicos cuya aparición se da principalmente en condiciones *post mortem* (ver sección de antecedentes y 2º capítulo de la presente tesis).

La producción de energía en estadios críticos del ciclo de muda puede también ser auxiliada por el incremento de fósforo, como es reportado durante la etapa de premuda tardía, con un incremento en los niveles de fósforo total en *Penaeus californiensis* en el organismo completo y en *Penaeus indicus* y *Macrobrachium nipponense* en músculo

abdominal (Huner *et al*., 1979; Vijayan y Diwan, 1996; Wang *et al*., 2003). Según Ellington (2001), la liberación de fosforo inorgánico (Pi) desempeña dos funciones fundamentales: (a) proporcionar un sustrato para la reacción de la glucógeno fosforilasa durante la glucogenólisis y (b) mejorar la capacidad tampón intracelular de H^+ no-bicarbonato. En este sentido, Wang *et al*. (2003) reportó que en músculo los niveles de Pi, en postmuda temprana y premuda tardía se incrementaron y fueron significativamente diferentes de las etapas de postmuda tardía, intermuda y premuda temprana; además estos cambios reportados de Pi que se presentan en músculo durante el ciclo de muda fueron similares a la CEA por lo que se sugiere que los niveles de Pi en el músculo pueden ser correlacionados con los cambios de energía durante el ciclo de muda y reflejan un aumento en la actividad metabólica antes y después de la ecdisis. Esto, porque el fósforo tiene un papel integral en la función celular, como un componente clave de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas, ATP y enzimas clave (Coote *et al*., 1996; Cesar *et al*., 2006), además de servir en la construcción del nuevo exoesqueleto y el control de la deposición de carbonato de calcio como ya ha sido muy bien documentado (Bentov *et al*., 2016).

8.1.2 Actividad enzimática en los diferentes estadios del ciclo de muda

En el presente trabajo, se observó una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en hepatopáncreas en comparación con músculo. Esto concuerda con trabajos previos (Zenteno-Savín *et al*., 2006; Parrilla-Taylor *et al*., 2013; Robles-Romo *et al*., 2016) y se debe a que en los crustáceos el hepatopáncreas es un centro metabólico clave y las múltiples reacciones oxidativas que se presentan, pueden generar radicales libres (Hoguet y Key, 2007; Wang *et al*., 2012; Salaenoi *et al*., 2014). Además, el hepatopáncreas desempeña un papel importante en la defensa inmunitaria y en la destoxificación de xenobióticos (Vogt, 1994; Söderhäll y Cerenius, 1998).

Se ha sugerido que la enzima SOD está presente en todas las células que metabolizan el oxígeno, presumiblemente porque su función fisiológica es proporcionar

una defensa contra las reactividades potencialmente perjudiciales del radical superóxido (O2•-) generado en reacciones metabólicas aeróbicas (McCord *et al*., 1971). De este modo, la enzima SOD acelera la conversión de O2•- a H_2O_2 y O_2 lo cual evita los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Fridovich, 1998). En el presente trabajo, la SOD en el músculo fue la única enzima que presentó diferencias significativas durante el ciclo de muda, con un incremento durante el estadio A respecto a los estadios C y E. Un comportamiento similar se observó en el hepatopáncreas con un incremento significativo en el estadio A respecto a los estadios C y E. Esto era de esperarse ya que al incrementarse la actividad metabólica, el consumo de oxígeno y la CEA durante la ecdisis y el estadio A, se generó muy probablemente una acumulación de ERO. Li y Shah (2004), menciona que las mitocondrias son la fuente principal de superóxido en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones. Zhang *et al*. (2007) mencionan que todos los crustáceos tienen extracelularmente un CuSOD, un ZnSOD y dos tipos de MnSOD, uno citosólico (cMnSOD) y el otro mitocondrial (mMnSOD). El mMnSOD cataliza la dismutación de los radicales superóxido en las mitocondrias mediante la conversión de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno que será eliminado por la catalasa, y finalmente previene la interrupción del potencial en la membrana mitocondrial y el daño de las proteínas y ácidos nucleicos (Zhang *et al*., 2007). En el presente trabajo, el mMnSOD podría desempeñar un papel fundamental en la protección celular del estrés oxidativo tanto en músculo como en hepatopáncreas.

La catalasa es una enzima que opera en altas concentraciones de H_2O_2 (Yu, 1994; Fridovich, 1998); se localiza sólo en los peroxisomas por lo que solamente a altas concentraciones de H_2O_2 en la célula, la enzima puede ser difundida (Zhang *et al*., 2008). En el presente trabajo no se presentaron diferencia significativas en hepatopáncreas, pero si se registró actividad de CAT. En músculo no se pudo detectar la actividad de CAT durante el estadio de intermuda, pero si durante los estadios E y A, lo que indica hasta cierto punto un aumento de la actividad desde niveles indetectables a niveles ya detectados por medio de los métodos usados. Así, este incremento nuevamente refleja un

aumento en la síntesis de H_2O_2 debido a la alta actividad metabólica en las etapas de premuda y postmuda, en donde se genera O2•- que es convertido a H_2O_2 por la SOD. Estos resultados coinciden con *Scylla serrata* durante las mismas etapas del ciclo de muda (Salaenoi *et al*., 2014). Aparentemente, la catalasa juega un papel más importante en hepatopáncreas que en el músculo, sin embargo cuando la actividad metabólica y la CEA incrementan como ocurre durante los estadios E y A del ciclo de muda de *L. vannamei*, es necesario incrementar la actividad de CAT en músculo.

La GPx es una proteína multifuncional con actividad biológica de peroxidasa y se encarga de dismutar el H_2O_2 (Liu *et al*., 2007). A diferencia de catalasa, la GPx posee un alto grado de afinidad por el H_2O_2 y lo puede eliminar aún en muy bajas concentraciones (Johansson *et al*., 1995; Zhang *et al*., 2008). En el presente trabajo, se observó en el hepatopáncreas un incremento significativo en la actividad de GPx durante los estadio E y A (Tabla VII). En el mismo ámbito, Liu *et al*. (2010) reportan que el ciclo de muda en el camarón *Penaeus monodon* tuvo un efecto significativo en el estatus antioxidante, con un incremento en los niveles de expresión de GPx en la etapa D0/D1 y una ligera disminución en la etapa D2/D3 hasta el valor más bajo en el estadio C. En *Scylla serrata*, el glutatión (GSH) sustrato de la GPx incrementó en el hepatopáncreas en estadio de postmuda temprana (A1) y la mayor actividad de GSH en músculo, hepatopáncreas y branquias la observaron durante el estadio B1 (Salaenoi *et al*., 2014). Sin embargo, Hotard y Zou (2008) reportan que la actividad de GST no cambió durante el ciclo de muda en *Uca pugilator*, sugiriendo que la actividad de GST en el hepatopáncreas no está regulada por la hormona de la muda en este decápodo. Por ende, el incremento significativo de GPx en el hepatopáncreas durante el estadio A, puede ser necesario no sólo para la eliminación de H_2O_2 en músculo, sino que adicionalmente, podría estar actuando también en contra de hidroperóxidos, con la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) durante su acción reduciéndolos a los alcoholes correspondientes (Meister y Anderson, 1983; Fridovich, 1998; Bandyopadhyay *et al*., 1999). Las GPx han sido durante mucho tiempo consideradas como dispositivos antioxidantes que, en acciones concertadas con

SOD, previenen el daño oxidativo del tejido (Brigelius-Flohé y Flohé, 2003). La peroxidación lipídica se evaluó como un índice del daño inducido por ERO mediante la determinación del contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en músculo y hepatopáncreas. La concentración de TBARS durante el ciclo de muda fue menor en músculo que en el hepatopáncreas, lo cual ya ha sido documentado en *Cherax quadricarinatus* y *L. vannamei* (Zenteno-Savín *et al*., 2008; Parrilla-Taylor *et al*., 2013). El incremento durante el estadio A puede estar reflejando un aumento de los niveles de ERO, como el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo, que son consecuencia de un incremento en la actividad metabólica como ya ha sido mencionado y que no fue compensado por los incrementos de SOD y GPx. En cuanto al curso temporal de los cambios observados en el presente trabajo, el incremento de GPx durante la muda misma (estadio E) se anticipa al de TBARS que ocurrió ya en el estadio de postmuda, por lo cual al parecer no fue entonces suficiente para compensar el daño oxidativo, tal como ya se mencionó. Sin embargo, es más difícil explicar porque la SOD incrementó hasta la postmuda cuando se hubiese esperado un incremento previo por ser el "primer actor" involucrado en la respuesta antioxidante.

8.2 Cambios metabólicos, fisicoquímicos y lipídicos *post mortem* en *L. vannamei* en respuesta al estrés de cosecha

8.2.1 Efecto inmediato de la emersión y confinamiento en camarones capturados con atarraya a borde de un estanque

El efecto inmediato del estrés por emersión y el confinamiento se puede observar en el tiempo 0, cuando se comparan los grupos: sometidos a dicha condición de estrés y control, estos últimos inmediatamente puestos en hielo después de la captura. Los camarones sometidos a estrés tuvieron un 70% menos de IMP que los camarones del grupo control (Tabla VIII), un resultado algo sorprendente, ya que el IMP podría considerarse como un indicador del estrés que aumenta con la emersión (Paterson, 1993) y en el cultivo de *Penaeus esculentus,* cuando es cosechado por redes de arrastre durante

un tiempo de 15 min, presentan un de valor 0.7 µmol g^{-1} de IMP (Paterson *et al*., 1995). Sin embargo, en nuestro trabajo los niveles son todavía muy bajos en el tiempo 0 y la diferencia entre ambos grupos (0.16 µmol g^{-1}) es despreciable y por lo tanto de significado fisiológico mínimo. En cuanto al ATP, CEA y el ArgP, no se observaron diferencias significativas (Tabla VIII), aunque se esperaba un aumento en el uso de ATP disponible después de la emersión, según lo informado por Abe *et al*. (2007) en *Marsupenaeus japonicus* bajo condiciones de hipoxia, donde también el ArgP disminuyó después de 2 h y el ATP después de 6 h, mientras que la CEA no presentó cambios significativos. Por otro lado, se esperaba una disminución del ATP y la CEA en ambos grupos como resultado de la captura con atarraya, ya que los camarones capturados de esta manera presentan una respuesta de escape típica que disminuye la disponibilidad de energía celular en menos de un minuto (Robles-Romo *et al*., 2016) y esta disminución es más intensa cuando se retrasa la congelación incluso durante unos minutos (Robles-Romo *et al*., 2014). Sin embargo, tal disminución aparentemente no se produjo en el presente trabajo, ya que los niveles de ATP y la CEA son relativamente altos y comparables con los niveles obtenidos en camarones *L. vannamei* no perturbados (Robles-Romo *et al*., 2014; 2016). Una posible explicación de esta falta de efecto podría estar relacionada con la temperatura relativamente baja del agua en los estanques (24°C) y el aire (19°C), en contraste con los estudios de Robles-Romo *et al*. (2014; 2016) hecho a temperaturas del agua de 26-28°C. En este sentido una temperatura menor disminuye o suprime la respuestas de estrés de camarones lo cual ha sido demostrado en trabajos previos i) la respuesta de estrés en términos de aumento de lactato causada por la captura neta de camarón es prácticamente nula cuando se hace en diciembre en comparación con agosto (Racotta, resultados no publicados). Del mismo modo, la hipotermia leve (una disminución de 5°C por debajo de la temperatura ambiente) se probó y se utilizó con éxito para reducir la respuesta al estrés del camarón (aumento de la glucosa y el lactato) durante el muestreo en estanques (Zamora-Méndez, 2012). Por último, otras especies de crustáceos como *Marsupenaeus japonicus y Penaeus monodon* pueden mantener los niveles de CEA

durante muchas horas en condiciones de emersión, cuando son sometidos a temperaturas de 12 en comparación de 17 y 24°C (Paterson, 1993). Dado que *L. vannamei* se considera aún más tolerante que estas especies, la emersión durante 15 min no parece ser un estresor suficiente, al menos en términos metabólicos. Los niveles de ATP y CEA están fuertemente regulados a nivel celular a expensas de otros compuestos de alta energía como el ArgP. Los niveles obtenidos en el presente trabajo para el grupo control de ATP (8.2 µmol g^{-1}) y CEA (0.9) (Tabla VIII) estaban dentro del rango reportado para *L. vannamei* como camarones en condiciones basales (Robles-Romo *et al*., 2014, 2016), así como en otros crustáceos (Onnen y Zebe, 1983; Thébault *et al*., 1997; Abe *et al*., 2007; Gornik *et al*., 2010. Sin embargo, los niveles de ArgP en ambos grupos fueron considerablemente más bajos (2.2-2.4 µmol g^{-1}) en comparación con estudios previos con *L. vannamei* mantenidos en condiciones de laboratorio, con valores basales de 7 µmol g^{-1} (Robles-Romo *et al*., 2016), aquellos mantenidos en un estanque litoral, con valores basales de 20 µmol g^{-1} (Zamora-Méndez, 2012) y en *L. vannamei* obtenido de un estanque litoral y transferido individualmente a un tanque al interior de un laboratorio, presentan valores basales de 16.7 µmol g^{-1} (Robles-Romo *et al*., 2014). Antes de ser sometidos a emersión, los camarones de ambos grupos tratan de escapar de la red cuando son capturados. Dicha respuesta implica “coletazos” repetidos que se ha visto disminuyen en un 75% la cantidad de ArgP en 20 segundos (Robles-Romo *et al*., 2016). Por lo tanto, los niveles de ATP se mantuvieron aparentemente a expensas de la hidrólisis de ArgP, no sólo en camarones en condición de emersión, sino también en el grupo de control. Sugerimos que ArgP es más sensible como un indicador de emersión *ante mortem* y contribuye a mantener cantidades relativamente altas de ATP, que sólo caerían en condiciones más extremas o prolongadas de emersión y confinamiento, entre otras condiciones implícitas en la cosecha, cuando las reservas de ArgP ya están agotadas. En este sentido, algunos estudios indican que camarones o langostinos capturados con red de arrastre en el mar abierto y confinados en la red durante 1-2 h, presentaron niveles considerablemente muy bajos de ATP y CEA (Paterson *et al*., 1995; Gornik *et al*., 2010). Asimismo, en caso de camarones los valores de

ATP y CEA en camarones capturados en el mar son considerablemente menores que en los camarones cosechados en estanque (Paterson *et al*., 1995)

8.2.2 Efecto de las prácticas comunes de cosecha *ante mortem* sobre la calidad *post mortem* de *L. vannamei* a largo plazo

A las 12 h después de la captura, el ArgP ya no se detectó y el ATP presentó un nivel muy bajo. Consecuentemente, la CEA resultante se redujo de la misma manera. Gill (2000) menciona que en el músculo *post mortem*, la conversión de ATP a ADP, ADP a AMP y el AMP a IMP suele tener lugar dentro de las primeras 24 h. Nuestros resultados coinciden dado el ADP disminuyó y el AMP aumentó 22 veces a las 12 h. En ese mismo periodo la concentración de IMP tuvo su mayor aumento, hasta alcanzar su máximo valor a las 72h concomitantemente con un incremento más pronunciado de la Hx. Así, la concentración de nucleótidos adenílicos totales disminuyó a lo largo del tiempo de almacenamiento, lo cual concuerda con la degradación de éstos a IMP y Hx. Los cambios en la degradación de los nucleótidos adenlílicos, con un aumento simultáneo de IMP y un aumento final de Hx, son típicos de los cambios bioquímicos reportados en camarones peneidos (Gonçalves *et al*., 2013; Huang *et al*., 2016; Canizales-Rodriguez *et al*., 2015; Qiu *et al*., 2016). Dado que el curso temporal del AMP y el IMP no se vio afectado por el estrés *ante mortem*, las propiedades organolépticas (dulzura) conferidas por estos nucleótidos AMP e IMP (Tejada, 2009) al parecer no se alteraron.

La hipoxantina es un producto de la degradación del ATP y está asociada con la pérdida de frescura, lo que confiere un sabor amargo a los mariscos (Tejada, 2009), lo cual sugiere que el estrés si podría estar afectando la vida de anaquel del camarón en términos de esta variable. Sin embargo, para el camarón, los valores de 2 µmol g^{-1}, junto con el agotamiento completo del IMP, son indicadores de frescura dudosa (Fatima *et al*., 1981). En nuestro estudio, los valores en el día 6 fueron de 0.53 y 0.6 µmol g^{-1} que son menores que en el estudio de Fatima *et al*. (1981), así como en el músculo de *L. vannamei* durante el almacenamiento en hielo después de seis días que presentó 1 µmol g^{-1} (Huang *et al*.,

2014; Qiu *et al*., 2016), la vida útil del camarón banana *Penaeus merguiensis* fue de 4 días (Yamagata y Low, 1995) y de 10-17 días para langostinos australianos (Chinivasagam, 1996).

En el presente trabajo se esperaban valores más altos de Hx para el grupo de cosecha porque se suponía que la cascada de degradación de ATP se aceleraba por la emersión *ante mortem*, como en el caso de la langosta *Nephrops norvegicus* (Gornik *et al*., 2010). Esto no fue el caso aparentemente, porque los valores bajos de Hx alcanzados en el día 6 de almacenamiento, presentaron una diferencia mínima entre ambos grupos (0.07 µmol g^{-1}). Como se mencionó anteriormente, una de las razones de la falta de agotamiento *ante mortem* del ATP asociado al estrés de la cosecha, está relacionada con la temperatura del agua en noviembre, cuando la mayoría de las granjas están cosechando. Por lo tanto, no es evidente una pérdida de frescura relacionada con la práctica de cosecha analizada en el presente estudio que es muy común en varias granjas. Sin embargo, en los meses más cálidos, la situación podría ser diferente y la vida útil debería examinarse a diferentes temperaturas ambiente en el momento de la cosecha y evaluar la influencia de los diferentes procedimientos de recolección. Para el pez sierra de *Scomberomorus sierra*, las prácticas extremas utilizadas por el pescador (captura y traslado durante 6 h a temperaturas de verano de hasta 40°C, sin hielo) acelera claramente el aumento de hipoxantina y el valor K correspondiente, lo que disminuye la vida útil (Castillo-Yañez *et al*., 2007).

8.2.3 pH

Aunque el pH inicial post mortem varía según la especie, la captura y el estado nutricional (Huss, 1998), nuestros resultados están dentro del rango reportado por varios autores en el camarón blanco, con un pH inicial de 6.44 a 6.7 (Nirmal y Benjakul, 2009b; Ramirez-Guerra, 2012; Imran, 2013; Huang, 2014; Okpala, 2015). El incremento del pH *post mortem* observado en este trabajo es el resultado de la degradación enzimática endógena de aminoácidos y nucleótidos, así como la carga creciente de bacterias, con

liberación de amoníaco y otros compuestos nitrogenados, incluyendo trimetilamina y nitrógeno básico volátil total (Sikorski *et al*., 1990; Huss 1998; Imran 2013; Canizales-Rodriguez *et al*., 2015).

Se ha reportado un incremento en el pH de 0.44 en el camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (Canizales-Rodriguez *et al*., 2015) y de 0.8 en *L. vannamei* (Okpala, 2015) almacenado en hielo durante seis días. Después de seis días de la captura y almacenado en hielo el camarón *Pandalus borealis*, el pH incremento a 8.0, junto con un rechazo en la apariencia y el olor por un panel sensorial capacitado (Zeng *et al*., 2005). Para el camarón *Parapenaeus longirostris*, el rechazo se determinó cuando el pH aumentó a 7.6 después de siete días de almacenamiento (Goncalves *et al*., 2003). Por lo tanto, en el presente estudio, se puede concluir que el pH permanece entre niveles aceptables, sin ningún efecto adverso por el estrés *ante mortem*.

8.2.4 Color

Considerando los valores menores de a* y b* en el músculo de los camarones sometidos a estrés *ante mortem*, se infiere que la carne era ligeramente menos verde-azul, y de hecho estos valores corresponden a la zona gris de la esfera de color (ver Fig. 5). Los parámetros de color cambiaron ligeramente con el tiempo de almacenamiento, a partir de los valores iniciales de a* y b* (-0.39 y -0.55), indicando que viraron ligeramente a -0.79 y -0.58 a las 144 h. Los valores iniciales de a* y b* significan que el músculo tenía un color gris. El valor de a* fue menor en camarones sometidos a estrés lo que nuevamente indica tonalidades ligeramente más grisáceas y menos verde-azules. L* y el índice de blancura aumentaron a través del tiempo.

La disminución de cromaticidad a lo largo del tiempo observada en particular para camarones sometido a estrés indican una baja intensidad de color en la zona gris (opacidad). Se obtuvieron valores similares en *L. vannamei* por Okpala (2014). Cuando la cromaticidad se midió en la sección interna del músculo, C* fue menor que en la superficie y no se vio afectado por el tiempo de almacenamiento o el estrés. Los valores

de H° entre 240 y 250 en la superficie son similares a los observados por García-Sifuentes *et al*. (2013) para el camarón *L. vannamei*, correspondiente a la zona verde-azul atribuida a la crustacianina. La hipoxia *ante mortem* (5 h a 0.5 mg O_2 L^{-1}) aumentó ligeramente el H° a un color más azul en *L. vannamei* (García-Sifuentes *et al*., 2013), pero aparentemente no durante la emersión corta utilizada en nuestro estudio. Valores mucho más bajos de H° (~ 75) ocurrieron en *L. stylirostris* e indican un color amarillento (Canizales-Rodriguez *et al*., 2015). Estas diferencias podrían ser el resultado de la comparación entre diferentes especies, el tipo de agentes estresantes *ante mortem* o la porción de carne utilizada para el análisis de color. Dentro del músculo, H° fue considerablemente más bajo y bastante variable, con el valor más bajo (110) asociado con un color amarillento. Por el contrario, no se produjeron cambios en el índice de blancura en la superficie (Fig. 22e), pero el índice de blancura en la parte interior del músculo aumentó en relación con el tiempo de almacenamiento, lo que indica un aumento de la luminosidad del músculo, durante el almacenamiento en hielo, aunque esto ocurrió en periodos de almacenamiento de mayor tiempo (Canizales-Rodriguez *et al*., 2015). Nuestro estudio permite comparar las características del análisis de color entre la superficie externa, que tenía mayor intensidad de color (C*) y blancura/luminosidad (IB y L*), en comparación con la sección interna, y un color relativamente constante en la zona verde-azul En la parte externa, mientras que en la parte interna se observó mayor variabilidad en los valores de H °.

8.2.5 Agua expresable

Se sabe que el agua expresable y la capacidad de retención de agua, indican el porcentaje de agua que se libera o se retiene, respectivamente; Aunque las metodologías para su análisis difieren, los resultados de ambos pueden compararse porque el agua expresable más baja es igual a la mayor capacidad de retención de agua, que no cambió después de seis días en *L. stylirostris* almacenado a 0°C (Canizales Rodriguez *et al*., 2015). También la calidad sensorial se encontró inaceptable en *P. borealis* almacenado 6 días en hielo cuando la capacidad de retención de agua disminuyó 5% (Zeng *et al*., 2005), pero todavía fue aceptable el camarón kuruma *Marsupenaeus japonicus* almacenado durante

seis días, con un 10 % en el aumento en agua expresable (Rahman *et al*., 2000). En el presente trabajo el agua expresable no se vio afectada por la emersión. En contraste, la hipoxia *ante mortem* (5 h; 0.5 mg O_2 ml^{-1}) redujo la capacidad de retención de agua en el músculo de *L. vannamei* sólo durante los dos primeros días de almacenamiento (García-Sifuentes *et al*., 2013), mientras que la infección con bacterias causantes de hepatopancreatitis necrotizante, no afectó la capacidad de retención de agua (Avila-Villa *et al*., 2012). La mayor cantidad de agua expresable que se observa en el presente trabajo puede ser debido a la desnaturalización (agregación y/o hidrólisis) en la proteína miofibrilar del músculo y/o la exposición de aminoácidos hidrofóbicos al exterior de la proteína durante almacenamiento en frío (Canizales-Rodriguez, 2015; García-Sifuentes, 2013). El agua expresable en productos cárnicos es muy importante ya que muchas propiedades físicas como el color, la textura y la firmeza son parcialmente dependientes de la capacidad de retención del agua y/o de la cantidad de agua expresable.

8.2.6 Análisis del perfil de textura (APT)

Durante el tiempo de almacenamiento se observó un efecto significativo en la dureza y aunque la interacción no fue significativa, este efecto fue evidente sólo para el grupo control. Del mismo modo, la dureza de *L. vannamei* almacenado disminuyó en un 11% durante seis días a 4°C, sin embargo el camarón todavía fue considerado aceptable por el panel sensorial (Fu *et al*., 2014a). En los crustáceos, el ablandamiento de los músculos está asociado con la hidrólisis de las proteínas miofibrilares y colágenas (Sriket *et al*., 2011) y, por lo tanto, se observa una disminución de la dureza en camarones peneidos en condiciones *post mortem* (García-Sifuentes *et al*., 2013). Aunque no se observó ninguna diferencia estadística por efecto de estés *ante mortem*, se tuvieron valores más bajos al principio (24 h) y al final (144 h) del período de tratamiento para la condición de estrés. Avila-Villa *et al*. (2012) reportan menor dureza de una condición completamente diferente de estrés, una infección bacteriana durante 18 días en *L. vannamei*.

La elasticidad y la cohesión sólo se vieron afectadas por el estrés *ante mortem*, pero no por el tiempo de almacenamiento en hielo, con valores más bajos para la elasticidad y más altos para cohesividad. La elasticidad se define como la velocidad en la que un material deformado vuelve a su forma original después de que la fuerza que causó la deformación no se aplica, mientras que la cohesividad se define como la medida en la cual un material puede deformarse antes de romperse (Szczesniak, 2002). Por lo tanto, el músculo del camarón sometido a emersión podría sufrir más deformación antes de su ruptura, pero tarda más tiempo en volver a su forma original. Se han reportado valores de cohesividad para *L. vannamei* en condiciones similares, que van de 0.59 a 0.50 en 6 de almacenamiento (Fu *et al.*, 2014b). Sin embargo, los valores del trabajo presente son mayores, lo que sugiere una mayor recuperación de su estructura durante la pausa entre las compresiones. Así mismo se ha reportado para *L. vannamei* almacenado en frio, valores más elevados de elasticidad además de mostrar una disminución durante 6 días de almacenamiento; 0.88 a 0.72 (Zhang *et al.*, 2015) y 1 a 0.7 (Fu *et al.*, 2014a). Así mismo para *L. vannamei* se han reportado valores similares a nuestro trabajo en tiempo inicial que van de 0.61 (Li *et al.*, 2011) y 0.3 (Avila-Villa *et al.*, 2012). La elasticidad muscular fue mayor en *L. vannamei* para camarones muertos por inmersión en hielo que los que fueron decapitados individualmente a temperatura ambiente (Fu *et al*., 2014b). Por lo tanto, la elasticidad más alta observada en nuestro estudio en el grupo control es probablemente el resultado de la baja temperatura en el sacrificio, mientras que el grupo de la cosecha fue expuesto a temperatura ambiente durante 15 minutos adicionales. Debido a la desorganización de las miofibrillas (Fu *et al*., 2014a), la elasticidad se asocia a la calidad de la carne ya que la disminución en la condición *post mortem*, se puede sugerir que valores más bajos podrían estar asociados a una menor calidad de la carne en camarones sometidos a emersión.

Asociado a esto, es necesario agregar que aunque existen muchos trabajos que han realizado un análisis del perfil de textura (dureza, elasticidad y cohesividad), en *L. vannamei*, las condiciones *ante mortem*, el almacenamiento o el estadio son diferentes o

no se comentan (Li *et al.,* 2011, Nunak y Schleining, 2011, Imran *et al*., 2013, Fu *et al.,* 2014a). En este sentido, Veland y Torrissen (1999), señalan que factores en los métodos instrumentales como la velocidad de la deformación aplicada y cuando se aplica más de una deformación, la duración de la pausa entre deformaciones, además la dirección de la deformación con respecto a la dirección de las fibras musculares, probablemente afectará los resultados. En este sentido Nunak y Schleining (2011), menciona que los diversos tipos de especies así como el método y las condiciones instrumentales influyen en la discrepancia de los datos. De manera general los camarones de ambos grupos mantuvieron su firmeza, elasticidad y cohesividad durante estas condiciones de almacenamiento; sin embargo, las condiciones estresantes *ante mortem* pueden modificar algunas de estas características como la cohesividad y elasticidad, por lo que se requieren más estudios sobre el efecto del estrés *ante mortem* y su repercusión en la textura del músculo *post mortem*.

8.2.7 Hidroperóxidos (LOOH)

La evidencia de la oxidación primaria en lípidos está indicada por el aumento en LOOH a través del tiempo, como se encontró previamente en *L. vannamei* (Nirmal y Benjakul, 2009b; Okpala *et al*., 2014). Un proceso de peroxidación es consistente con los cambios observados en ácidos grasos libres y ácidos grasos altamente instaurados (resultados reportados en el artículo derivado de esta tesis) ya que los ácidos grasos en su forma libre y con más dobles enlaces son más propensos a la oxidación (Shahidi, 1998; Takeungwongtrakul *et al*., 2012). Se observó un mayor contenido de LOOH en camarones sometidos a estrés, principalmente al inicio y al final del período de almacenamiento analizado, lo que sugiere que el estrés de la cosecha podría afectar la calidad del músculo de camarón en términos de percepción sensorial y calidad nutricional ya que los lípidos oxidados están asociados no solo al deterioro del sabor sino que también a los efectos negativos sobre la salud humana (Shahidi, 1998). Como se sugirió anteriormente para los subproductos de nucleótidos, la peroxidación de lípidos causada por la emersión durante la cosecha podría agravarse cuando la cosecha se hace en los meses más cálidos del año.

9. CONCLUSIONES

- En el ciclo de muda *L. vannamei* requiere grandes importes de energía durante la ecdisis y la postmuda temprana, siendo necesaria esta energía en múltiples funciones fisiológicas así como en el rompimiento y liberación del exoesqueleto.
- La disminución del glucógeno durante la ecdisis en el ciclo de muda de *L. vannamei* se relaciona con el requerimiento de energía para satisfacer una serie de necesidades fisiológicas asociadas con la muda incluyendo el rompimiento y la liberación del exoesqueleto.
- El incremento de ATP y de ArgP como reserva inmediata, además de satisfacer las necesidades arriba mencionadas, puede representar una estrategia de *L. vannamei* para evitar posibles depredadores o canibalismo, porque durante estos estadios (E y A) el camarón se encuentra sin protección del exoesqueleto y depende exclusivamente de la respuesta de escape para evitar circunstancias peligrosas.
- Existe un incremento en la actividad enzimática antioxidante durante la ecdisis y la postmuda temprana, lo cual refleja un incremento en los niveles de ERO, que son consecuencia de un incremento en la actividad metabólica.
- A partir de la evaluación histológica de la cutícula, la epidermis y los cambios sub-epidérmicos que se producen en los urópodos durante el ciclo de muda en *L. vannamei*, se concluye que este método no es adecuado por ser técnicamente más laborioso y costoso que el método tradicional de observación directa de urópodos y porque dificulta la distinción entre estadios de premuda D0, D1 y D2, e incluso el estadio D3.
- La respuesta fisiológica de *L. vannamei* durante el proceso de cosecha que implica captura y emersión, indica que el estrés de demanda energética estuvo presente en ambos grupos y fue amortiguado por el ArgP.

- El estrés antemortem por la emersión durante la cosecha, se refleja en una menor elasticidad y una mayor cohesividad muscular que puede deberse a cambios estructurales y de composición en proteínas y lípidos.
- El estrés antemortem por la emersión durante la cosecha, produce una acumulación ligeramente mayor de hipoxantina y de peróxidos productos de la oxidación lipídica en la fase final del período de almacenamiento (6 días), lo que puede afectar la calidad de la carne en términos de percepción sensorial y calidad nutricional, particularmente a temperaturas ambientales más altas (por ejemplo, cosecha en verano) y para una duración de almacenamiento en hielo mayor a 6 días.
- Sin embargo, a excepción de lo anterior, se concluye de una manera más general que las prácticas de cosecha evaluados en el presente estudio no afecten sustancialmente la calidad de la carne de camarón, en la condiciones evaluadas: cosecha en el mes de noviembre

10. LITERATURA CITADA

Abe, H., S. Hirai, S. Okada. 2007. Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. Comp. Biochem. Phys. A. Mol. Integr. Physiol. 146:40-46.

Aebi, H., P. Lester. 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105:121-126.

Aguilar, V., I. S. Racotta, E. Goytortúa, M. Wille, P. Sorgeloos, R. Civera, E. Palacios. 2012. The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. Aquac. Nutr. 18:258-271.

Aguilar-Medina, V. 2009. Efecto del ácido araquidónico sobre la susceptibilidad al estrés por alta densidad, la producción de PGE2 y la respuesta inmune del camarón blanco del pacifico *Litopenaeus vannamei*. Tesis (Maestría en uso, manejo y preservación de los recursos naturales). La Paz, B.C.S. México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 118p.

Albalat, A., S. Sinclair, J. Laurie, A. Taylor, D. Neil. 2010. Targeting the live market: Recovery of Norway lobsters *Nephrops norvegicus* (L.) from trawl-capture as assessed by stress-related parameters and nucleotide breakdown. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 395:206-214.

Albalat, A., S. G. Gornik, R. J. A. Atkinson, G. H. Coombs, D. M. Neil. 2009. Effect of capture method on the physiology and nucleotide breakdown products in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). Mar. Biol. Res. 5:441-450.

Ali, A., A. Harrison, F. Jensen. 1999. Effect of some ante-mortem stressors on peri-mortem and post-mortem biochemical changes and tenderness in broiler breast muscle: a review. Worlds Poult. Sci. J. 55:403-414.

Allen, J., St. Angelo. 1996. Lipid oxidation in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36(3):175-224.

Angelo, A. J. S., J. Vercellotti, T. Jacks, M. Legendre. 1996. Lipid oxidation in foods. J. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36:175-224.

Aoki, T., R. Ueno. 1998. Involvement of cathepsins B and L in post-mortem autolisys of mackerel muscle. Food Res. Int. 30:585-591.

Aparicio, B. S., M. Piñón, R. Racotta, I. S. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. Aquaculture. 298:308-314.

Aparicio-Simón, B. S. 2009. Respuestas neuroendocrina y metabólica de estrés por manipulación e hipoxia en el camarón blanco *Litopaneus vannamei* (Boone, 1931). Tesis

(Doctorado en Ciencias). La Paz, B.C.S. México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 106p.

Atkinson, D. E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochem. 7:4030-4034.

Atkinson, D. E., G. M. Walton. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. J Biol. Chem. 242:3239-3241.

Auro, O. A., C. L. Ocampo. 1999. Diagnóstico del Estrés en Peces. Vet. Méx. 30(4):337-344.

Avila-Villa, L. A., G. García-Sánchez, T. Gollas-Galvan, J. Hernandez-Lopez, M. E. Lugo-Sanchez, M. Martinez-Porchas, R. Pacheco-Aguilar. 2012. Textural changes of raw and cooked muscle of shrimp, *Litopenaeus vannamei*, infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB). J. Texture Stud. 43:453-458.

Bandyopadhyay, U., D. Das, R. K. Banerjee. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. Curr. Sci. 77:658-666.

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

Baumberger, J. P., J. M. D. Olmsted. 1928. Changes in the Osmotic Pressure and Water Content of Crabs during the Molt Cycle. Physiol Zool. 1(4):531-544.

Bentov S., E. D. Aflalo, J. Tynyakov, L. Glazer, A. Sagi. 2016. Calcium phosphate mineralization is widely applied in crustacean mandibles. Sci. Rep. 6:1-10.

Betteridge, D. J. 2000. What Is Oxidative Stress?. Metabolism. 49(2):3-8.

Bonilla-Gómez, J., X. Chiappa-Carrara, C. Galindo, G. Jeronimo, G. Cuzon, G. Gaxiola. 2012. Physiological and Biochemical Changes of Wild and Cultivated Juvenile Pink Shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Crustacea: Penaeidae) during Molt Cycle. J. Crust. Biol. 32(4):597-606.

Booth, C. E., B. R. McMahon, A. W. Pinder. 1982. Oxygen Uptake and the Potentiating Effects of Increased Hemolymph Lactate on Oxygen Transport During Exercise in the Blue Crab, *Callinectes sapidus.* J. Comp. Physiol. 148:111-121.

Bosma, R. H., M. C. J. Verdegem. 2011. Sustainable aquaculture in ponds: Principles, practices and limits. Livest. Sci. 139(1-2):58-68.

Botta, J. R. 1994. Freshness quality of seafoods: a review. En: Shahidi F., Botta J. R. Seafoods (eds.). Chemistry, Processing Technology and Quality. Springer Science. Primera edición. Singapore. pp. 140-162.

Bourne, M. C. 2002. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. Elsevier Science & Technology Books. Segunda edición. pp. 1-30.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Bridges, C. R. 2001. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. J. Exp. Biol. 204:1021-1032.

Brigelius-Flohé, R., L. Flohé. 2003. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation?. BioFactors. 17:93-102.

Buckup, L., B. K. Dutra, F. P. Ribarcki, F. A. Fernandes, C. K. Noro, G. T. Oliveira, A. S. Vinagre. 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. Comp. Biochem. Physiol. A. 149:59-67.

Buettner, G. R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alphatocopherol and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. 300:535-543.

Canizales-Rodríguez, D. F., V. M. Ocaño-Higuera, E. Marquez-Rios, A. Z. Graciano-Verdugo, J. L. Cárdenas-López, M. S. Yepiz-Gómez, F. J. Castillo-Yáñez, 2015. Biochemical, physical, chemical, and microbiological assessment of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) stored in ice. J. Aquat. Food Prod. T. 24:259-269.

Castillo-Yañez, J. F., R. Pacheco-Aguilar, E., Márquez -Ríos, M. E. Lugo-Sánchez, J. Lozano-Taylor. 2007. Freshness loss in sierra fish (*Scomberomorus sierra*) muscle stored in ice as affected by postcapture handling practices. J. Food Biochem. 31:56-67.

Carvalho, P. S. M., V. N. Phan. 1998. Oxygen consumption and ammonia excretion during the moulting cycle in the shrimp *Xiphopenaeus koryeri*. Comp. Biochem. Physiol. 119A(3):839–844.

Cesar, J. R. O., B. Zhao, S. Malecha, H. Ako, J. Yang. 2006. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. Aquaculture. 261:688-694.

Cesar, O. J. R., J. Yang. 2007. Expression Patterns of Ubiquitin, Heat Shock Protein 70, a-Actin and b-Actin Over the Molt Cycle in the Abdominal Muscle of Marine Shrimp *Litopenaeus Vannamei*. Mol. Reprod. Dev. 74:554-559.

Chan, S. M., S. Rankin, L. Keeley. 1988. Characterization of the moult stages in *P. vannamei*: Setogenesis and haemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. The Biol. Bull. 175:185-192.

Chang, E. S. 1989. Endocrine regulation of molting in Crustacea. Rev. Aquat. Sci. 1:131-157.

Chang, E. S. 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 193:1-14.

Chang E. S., R. Keller, S. A. Chang. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. Gen. Comp. Endocrinol. 111(3):359-66.

Chang E. S., D. L. Mykles. 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. Gen. Comp. Endocrinol. 172:323-330.

Chang, E. S., J. D. O'Connor. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: Mantel L.H. The biology of Crustacea. Vol. 5. Academic Press, New York. pp. 263–289.

Chapman, R., K. Mackay. 1949. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. J. Am. Oil Chem. Soc. 26(7):360-363.

Chen, J. C., S. Y. Cheng 1994. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite. J. Comp. PhysioL. B. 164:530-535.

Chen, J.C., S.Y. Cheng, C. T. Chen. 1994. Changes of hemocyanin, protein and free aminoacid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiology. 109 A: 339-347.

Cheng, W., L. Chun-Hung, Y. Da-Fun, C. Jiann-Chu. 2002. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stag. Aquaculture. 211: 325–339.

Chrousos, G. P., P. W. Gold, 1992. The concepts of stress and stress system disorders. In: Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA. 267:1244-1252.

Chung, J. S., S. G. Webster. 2003. Moult cycle-related changes in biological activity of moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. Eur. J. Biochem. 270: 3280–3288.

Chung, J.S., N. Zmora. 2008. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab*, Callinectes sapidus*- the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. FEBS J. 275, 693–704.

Cizewski-Culotta, V., M. Yang, T. V. O'Halloran. 2006. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. Biochimica et Biophysica, 1763: 747–758.

Coote T.A., P.W. Hone, R. Kenyon, G.B. Maguire. 1996. The effect of different combinations of dietary calcium and phosphorus on the growth of juvenile Haliotis laevigata. Aquaculture, 145: 267-279.

Cuzon, G., C. Rosas, G. Gaxiola, G. Taboada, V. A. Wormhoudt. 2000. Utilization of carbohydrates by shrimp. En: Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. A Olvera-Novoa, R. Civera-Cerecedo (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

Dehn, P., P. Haya, D. Aiken. 1985. Adenylate energy charge, arginine phosphate and ATPase activity in juvenile *Homarus americanus* during the molt cycle. Comp. Biochem. Physiol. 81B:629–633.

Derr, R. F., L. Zieve. 1972. Adenylate energy charge: Relation to guanylate energy charge and the adenylate kinase equilibrium constant. Biochem. Biophys. Res. Commun., 49 (6): 1385-1390.

Domenici, P., J. M. Blagburn, J. P. Bacon. 2011. Animal escapology I: theoretical issues and emerging trends in escape trajectories. J. Exp. Biol. 214:2463- 2473.

El Haj, A. J., S. Clarke, P. Harrison, E. Chang. 1996. In vivo muscle protein synthesis rates in the American lobster *Homarus americanus* during the moult cycle and in response to 20-hydroxyecdysone. J. of Exp. Bio., 199: 579-585

Ellington, W.R. 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annu. Rev. Psychol. 63:289-325.

Emmerson, W. D. 1985. Oxygen consumption in *Palaemon pacificus* (stimpson) (Decapoda: Palaemonidae) in relation to temperature, size and season. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology, 81(1):71-78.

Ezquerra, B. E., J.A. Salazar, B. L. Alvarado, O. S. Rouzaud. 2003. Effect of dietary protein on muscle collagen, collagenase and shear force of farmed white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Eur. Food Res. Technol. 217 pp 277–280.

Fagali, S. N. 2011. Peroxidación de diferentes especies lipídicas: efecto de antioxidantes. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de ciencias exactas departamento de química. 160p.

Fanjul-Moles M. L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 142:390–400.

Fanjul-Moles, M. L., M. E. Gonsebatt. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Systems in Crustacean Life Cycles. En: Abele D., J. P. Vázquez-Medina,T. Zenteno-Savín (eds.).

Oxidative stress in aquatic ecosystems. Editorial Wiley-Blackwell. Primera edición. India. pp 208-223.

FAO 2006-2017. Software para la pesca y la acuicultura. FishStat Plus - Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 28 November 2013. [Citado 26 August 2017]. http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/es

FAO. 2012. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. Roma.

FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200p.

Fatima, R., B. Farooqui, R. B. Qadri. 1981. Inosine monophosphate and hypoxanthine as indices of quality of shrimp (*Penaeus Merguensis*). J. of Food Sci. 46:1125-1127.

Fingerman, M. 1997. Crustacean endocrinology: a restrospective, prospective and instrospective analisis. Physiology Zool. 70(3):257-269.

Flores, Q. C. 2002. Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. Rev.ictiol. 10(1/2):57-78.

Flohé, L., W. A. Günzler. 1984. Assays for glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105:114-120.

Fotedar, S., L. Evans. 2011. Health management during handling and live transport of crustaceans: A review, J. Invertebr. Pathol. 106:143-152.

Francis, F. J., F. M. Clydesdale. 1975. Food Colorimetry: Theory and applications. AVI Publ. Co., Westport, CT. 477.

Fraser, D. I., H. M. Weinstein, W. J. Dyer. 1965. Post-Mortem Glycolytic and Associated Changes in the Muscle of Trap- and Trawl-Caught Cod . J. Fish Res. Board Can. 22(1):83-100.

Fraser, O., S. Sumar. 1998. Compositional changes and spoilage in fish–an introduction. Nutr. Food Sci. 5, 275-279. Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. 201: 1203-1209.

Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. 201: 1203-1209.

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

Fu, L., X. Chen, Y. Wang. 2014b. Quality evaluation of farmed whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, treated with different slaughter processing by infrared spectroscopy. Food Chem. 151: 306-310.

Galindo F., A. Flores. 2006. De la energética a la neurotransmisión: el adenosín trifosfato y sus receptores. Rev. Neurol. 43(11):667-677.

Galindo, C., G. Gaxiola, G. Cuzon, X. Chiappa-Carrara. 2009. Physiological and biochemical variations during the molt cycle in juvenile *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions. J. Crust. Biol. 29(4): 544-549.

García, U., H. Arechiga. 1998. Regulation of Crustacean Neurosecretory Cell Activity. Cellular and Molecular Neurobiology, 18(1):921-924.

García-Sifuentes, C. O., R. Pacheco-Aguilar, S. M. Scheuren-Acevedo, G. Carvallo-Ruiz, G. García-Sánchez, T. Gollas-Galván, J. Hernández-López. 2013. Effect of ante-mortem hypoxia on the physicochemical and functional properties of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle stored on ice. Food Sci. Technol. Int. 19:261-269.

Gill, T. 2000. Nucleotide-Degrading Enzymes. En: Haard N. F., Simpson B. K. Ed. (eds.). Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality. Editorial Board. Primera edición. New York. pp 37-68.

Goncalves, A. C., M. E. López-Caballero, M. L. Nunes. 2003. Quality changes of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) packed in modified atmosphere. J. of Food Sci. 68: 2586-2590.

Gornik, S. G., A. Albalat, R. J. A. Atkinson, G. H. Coombs, D. M. Neil. 2010. The influence of defined ante-mortem stressors on the early post-mortem biochemical processes in the abdominal muscle of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus, 1758). Mar. Biol. Res. 6:223-238.

Gray, J. L., A. M. Pearson. 1994. Lipid-derived off-flavours in meat-formation and inhibition. En: Shahidi F. (eds.). Flavor of Meat and Meat Products. Primera edicion. Chapman y Hall. pp 116-139.

Gutteridge, J. M. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem. 41:1819-1828.

Gwinn, J. F., J. R. Stevenson. 1973. Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish. I. Correlation of 14C-acetylglucosamine incorporation with stages of the molting cycle. Comp. Biochem. Physiol. B, 45(4):769-776.

Gyalog, G., L. Varadi, D. Gál. 2011. Is intensification a viable way for pond culture in Central and Eastern Europe?. AACL Bioflux, 4(5): 584-589.

Haard, N. F. 1993. Technological Aspects of Extending Prime Quality of Seafood: A Review. Journal of Aquatic Food Product Technology, 1(3/4): 9-27.

Haard, N. F. B. K. Simpson, B. S. Pan. 1994. Sarcoplasmic proteins and other nitrogenous compounds. En: Sikorski Z. E., B. S. Pan, F. Shahidi (eds.). Seafood Proteins. Editorial Chapman & Hall. New York. pp 13-39.

Haard N., F., B. K. Simpson. 2000. Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality. Ed. Board. 681p.

Hagerman, L. 1976. The respiration during the moult cycle of *Crangon vulgaris* (Fabr.) (Crustacea, natantia). 15 (1): 15-21.

Halliwell, B. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. Nutr Rev. 55:44-49.

Halliwell, B. 2009. The wanderings of a free radical. Free Radic. Biol. Med. 46:531-542.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. Nueva York. 851p.

Hermes-Lima, M., T. Zenteno-Savín. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. Comp. Biochem. Physiol C. 133(4):537-556.

Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. En: Storey, K.B. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. John Wiley & Sons. New Jersey, N.Y. pp. 319-368.

Hoguet, J., P. B. Key. 2007. Activities of biomarkers in multiple life stages of the model crustacean, *Palaemonetes pugio*. J. of Exp. Mar. Biol. and Ecol. 353(2): 235-244.

Hotard, S., E. Zou. 2008. Activity of Glutathione S-Transferase in the Hepatopancreas is not Influenced by the Molting Cycle in the Fiddler Crab, *Uca pugilator*. Bull. Environ Contam. Toxicol. 81:242–244.

Hou, C., F. Wang, S. Dong, Y. Zhu. 2011. The effects of different Ca21 concentration fluctuation on the moulting, growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquac. Res. 42:1453-1459.

Huang, Y., M. Guevara, C. Shiau. 2016. Changes in Biochemical Compositions and Quality of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) During Storage. J. Aquat. Food Prod. T. 25(1):35-45.

Hucul, J. A., E. C. Henshaw, D. A. Young. 1985. Nucleoside diphosphate regulation of overall rates of protein biosynthesis acting at the level of initiation. J. Biol. Chem. 260(29):15585-15591.

Hui, Y. H. 2007. Factors Affecting Food Quality: A primer. En: Nollet L. M. L., T. Boylston, F. Chen, P. C. Coggins, M. B. Gloria, G. Hyldig, C. R. Kerth, L. H. McKee, Y. H. Hui. (eds.).Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality. Editorial Wiley-Blackwell. Primera edición. U. S. A. pp 3-6.

Hultin, H. O. 1994. Oxidation of lipids in seafoods. En: Shahidi F., J. R. Botta, (eds.). Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality. Editorial Chapman & Hall. Primera edición. pp 49-71.

Humanson, L. G. 1979. Animal Tissue Techniques. W. H. Freeman and Company. Cuarta edición. U.S.A. San Francisco. 661 pp

Huner, J. V., L. B. Colvin, B.L. Reid. 1979. Whole-body calcium, magnesium and phosphorous levels of the California brown shrimp, *Penaeus californiensis* (Decapoda: Penaeidae) as functions of molt stage. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 64(1): 33-36.

Huss, H. H. 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Colección FAO: Pesca, No.348. Dinamarca. 132p.

Huss, H. H., L. Ababouch, L. Gram. 2003. Assessment and management of seafood safety and quality. FAO Fisheries Technical Paper. No. 444. Rome, FAO. 230p.

Imran, A., J. Chawalit, K. Somrote. 2013. Characterization of quality degradation during chilled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) supply chain. Int. Food Res. J. 20(4):1833-1842.

Jiang, S. T., F. P. Nei, H. C. Chen y Wang J. H. 1992. Comparative Study on the Cathepsin D from Banded Shrimp (*Penaeus japonicus*) and Grass Shrimp (*Penaeus monodon*). J. Agric. Food Chem. 40: 961-966.

Jiang, S.T. 2000. Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. J. Agric. Food Chem. 2:55-74.

Jimenez, A. G., S. T. Kinsey. 2015. Energetics and Metabolic Regulation. En: Chang E. S., M. Thiel (eds.). The Natural History of the Crustacea Series Vol. 4. Editorial Advisory Board. pp. 391-419

Johansson, M. W., M.L. Lind, T. Holmblad, P. O. Thornqvist, K. Söderhäll. 1995. Peroxinectin a novel cell adhesion protein from crayfish blood. Biochem. Biophys. Res. Commun. 216:1079–1087.

Juárez, M., N. Aldai, Ó. López-Campos, M. E. R. Dugan, B. Uttaro, and J. L. Aalhus. 2012. Beef Texture and Juiciness. En: Hui Y. H. (eds.). Handbook of Meat and Meat Processing. Editorial CRC Press. Segunda Edición. Canadá. pp. 177-206.

Kristoffersen, S., T. Tobiassen, V. Steinsund, R. L. Olsen. 2006. Slaughter stress, postmortem muscle pH and rigor development in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua L.*). Int. J. Food Sci. Technol. 41:861-864.

Laidley, C. W., F. F. Leatherland. 1988. Circadian studies of plasma cortisol, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 33:73-88.

Lawless H.T., Heymann H. 1998. Sensory Evaluation of Food. Principles and Practices. Chapman & Hall, New York, pp 379–405.

Le Coz, J.R. 1989. La charge energétique adenylique: Mise au point, application a trois mollusques bivalves, synthèse et perspectives. Ed. IFREMER, 104p.

Li J. M., A. M. Shah. 2004. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 287:R1014–R1030.

Li X., Z. Li, H. Lin, H. Samee. 2011. Effect of power ultrasound on the immunoactivity and texture changes of shrimp (*Penaeus vannamei*). Czech J. Food Sci. 29(5): 508–514.

Li, Z., X. Li, Z. Wang, Q. W. Shen, D. Zhang. 2016. Antemortem stress regulates protein acetylation and glycolysis in postmortem muscle. Food Chem. 202:94-98.

Liu C., M. Tseng, W. Cheng. 2007. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, Litopenaeus vannamei, and its expression following Vibrio alginolyticus infection. Fish Shellfish Immunol. 23: 34-45.

Liu, K. F., M. S. Yeh, G. H. Koua, W. Cheng, C. F. Lo. 2010. Identification and cloning of a selenium-dependent glutathione peroxidase from tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its transcription following pathogen infection and related to the molt stages. Dev. Comp. Immunol. 34:935–944.

Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42:656–666.

Logan, A., U. Nienaber, X. S. Pan. 2013. Lipid oxidation Challenges in food systems. AOCS press. 548p.

Lonergan, E. H., W. Zhang, S. M. Lonergan. 2010. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. Meat Sci. 86(1):184-195.

Lorenzon, S. 2005. Hyperglycemic stress response in Crustacea. Invertebrate Surviv. J. 2:132-141.

Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat. Toxicol.101:13-30.

MacDougall. 1994. Colour of meat. En: Pearson A. M., T. R. Dutson (eds.). Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products. Editorial Chapman & Hall. Primera edición. pp 79-92.

Marazza, D. P. H. Bornens, Y. L. Gal. 1996. Effect of Ammonia on Survival and Adenylate Energy Charge in the Shrimp *Palaemonetes varians.* Ecotoxicol. Environ. Saf. 34:103–108.

McCord, J. M., B. B. Keele, I. Fridovich. 1971. An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis: The Physiological Function of Superoxide Dismutase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68(5):1024-1027.

Meister, A., M. E. Anderson. 1983. Glutathione. Annu. Rev. Biochem. 52:711–760.

Mercier, L., E. Palacios, A. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramírez, R. Hernández-Herrera y I. Racotta 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture, 258: 633-640.

Mercier, L., I. Racotta, G. Yepiz-Plascencia, A. Muhlia-Almaza, R. Civera, M. Quiñones-Arreola, M. Wille, P. Sorgeloos, E. Palacios. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. Aquacult. Res. 40:1849-1863.

Mihaljevic, B., Katusin-Razem, B., Razem, D. 1996. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. Free Radic. Biol. Med. 21:53-63.

Min, B., D. U. Ahn. 2005. Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. Food Sci. Biotechnol. 14(1):152-163.

Moal, J., J.R. Le Coz, J.F. Samain, J.Y. Daniel. 1991. Adenylate energy charge: A possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. Comp. Biochem. Physiol. C. 100:201–205.

Moal, J., J. R. Le Coz, J. F. Samain, J. Y. Daniel. 1989. Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography. Comp. Biochem. Physiol. 93B:307-316.

Morris, S., M., A. M. Adamczewska. 2002. Utilisation of glycogen, ATP and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 133:813–825.

Morris, S., W. J. V. Aardt, M. D. Ahern. 2005. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia. Aquat. Toxicol. 75:16–31.

Morrisey, P. A., D. J. Buckley, P. J. A. Sheehy, F. J. Monahan. 1994. Vitamin E and meat quality. Proc. Nutr. Soc. 53:289-295.

Mugnier, C., E. Zipper, C. Goarant, H. Lemonnier. 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. Aquaculture, 274:398-407.

Murray, A. C. 1989. Factors affecting beef color at time of grading. Canadian Journal of Animal Science, 69(2): 347-355.

Neil, D. M. 2012. Ensuring crustacean product quality in the post-harvest phase. J. Invertebr. Pathol. 110:267-275.

Nirmal, N. P., S. Benjakul. 2009a. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. Food Chem. 116:23–331.

Nirmal, N. P., Benjakul, S. 2009b. Melanosis and Quality Changes of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Treated with Catechin during Iced Storage. J. Agric. Food Chem. 57:3578–3586.

Nunak, N., G. Schleining. 2011. Instrumental Textural Changes in Raw White Shrimp During Iced Storage. J. Aquat. Food Prod. T. 20:350–360.

Okpala, C. O. R. 2016. Lipid autoxidation in ozone-processed crustacea under cold storage: A treatise. Lipid Technol. 28(5-6):93-95.

Okpala, C. O. R. 2014. Investigation of quality attributes of ice-stored Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by sequential minimal ozone treatment. LWT-Food Sci. Technol. 57:538-547.

Okpala, C. O. R. 2015. The physicochemical changes of farm-raised Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as influenced by iced storage. Food Nutr. Sci. 6:906-922.

Okpala, C. O. R., W. S. Choo, G. A. Dykes. 2014. Quality and shelf life assessment of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) freshly harvested and stored on ice. LWT-Food Sci. Technol. 55:110-116.

Oliveira G. T., F.A. Fernandes, G. Bond-Buckup, A.A. Bueno, R.S.M. Silva. 2003. Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). Memoirs of Museum Victoria, 60(1): 59–62.

Onnen, T., E. Zebe. 1983. Energy metabolism in the tail muscles of the shrimp *Crangon crangon* during work and subsequent recovery. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 74:833–838.

Palombo, R., G. Wijngaards. 1990. Kinetics analysis of the effect of some processings factors on changes in color of comminuted meats during processings. J. Food Sci. 55: 604-612.

Parvathy, K. 1971. Blood sugar metabolism during moulting in the isopod crustacean *Ligia exotica*. Marine Biology, 9(4):323–327.

Parrilla-Taylor D. P., T. Zenteno-Savín, F. J. Magallón-Barajas. 2013. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. Aquaculture, 380–383:41–46.

Pascual, C., G. Gaxiola, C. Rosas. 2003. 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.

Passano, L. M. 1960. Low temperature blockage of molting in *Uca pugnax.* Biol. Bull. 118(1):129-136.

Paterson, B. D. 1993. The rise in inosine monophosphate and l-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. Comp. Biochem. Physiol. 106B(2):395-400.

Paterson, B. D., B. G. B. Goodrick, S. G. Grauf. 1995. Inosine Monophosphate (IMP) concentration in shrimp flesh cannot be used as an index of "freshness" when comparing shrimp that have been harvested in different ways. J. Aquat. Food Prod. T. 4(3):59-74.

Pérez-Rostro, C. I., I. S. Racotta, A. M. Ibarra. 2004. Decreased genetic variation inmetabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 302:189-200.

Persky, A. M., P. S. Green, L. Tubley, C. O. Howell, L. Zaulyanov, , G. A. Brzaeau, J. W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 223:59–66.

Pickering, A. D. 1981. Introduction: The Concept of Biological Stress. En: Stress and Fish. (Pickering, A. D.) Academic Press. London. 1-9.

Piedrahita, R. H. 2003. Reducing the Potential Environmental Impact of Tank Aquaculture Effluents through Intensification and Recirculation. Aquaculture, 226:35-44.

Poli, B. M., G. Parisi, F. Scappini, G. Zampacavallo. 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. Aquac. Int. 13:29-49.

Porter, N. A., S. E. Caldwell, K. A. Mills. 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. Lipids. 30:277-290.

Qiu, W. Q., S. S. Chen, J. Xie, Y. H. Qu, X. Song. 2016. Analysis of 10 nucleotides and related compounds in *Litopenaeus vannamei* during chilled storage by HPLC-DAD. LWT-Food Sci. Technol. 67:187-193.

Racotta, I., E. Palacios, L. Méndez. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Mar. Fresh. Behav. Physiol. 35(4):269-275.

Racotta, I. S., R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiol. 125A:437-443.

Racotta, I. S., E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 29: 351-356.

Rahman, M., L. Yasmin, M. Kamal, M. Islam, S. Ahmed, M. Mazid. 2000. Studies on the post-mortem changes in shrimp and prawn during ice storage. Pt. 1. Organoleptic and physical changes. Bangladesh J. of Fish. Res. 4:83-89.

Ramírez-Guerra, H. E., C. O. García-Sifuentes, R. Pacheco-Aguilar, J. C. Ramirez-Suarez, M. E. Lugo-Sánchez, S. M. Scheuren-Acevedo. 2012. The influence of ante-mortem hypoxia on the physicochemical stability of myofibrillar proteins in the muscle tissue of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to multiple freeze-thaw cycles. Eur. Food Res. Technol. 235:37-45.

Ribas, L., R. Flos, L. Reig, S. MacKenzie, B. A. Barton, L. Tort. 2007. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. Aquaculture, 269(1):250-258.

Robles-Romo, A. 2014. Estado energético del Camarón *Litopenaeus vannamei* en la respuesta de escape hasta un estado de agotamiento. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz B.C.S. México. 116p.

Robles-Romo, A., O. Arjona, I. S. Racotta. 2014. Influence of sampling, storage, processing and optimal experimental conditions on adenylate energy charge in penaeid shrimp. Arch. Biol. Sci. 66:651-666.

Robles-Romo, A., T. Zenteno-Savín, I. S. Racotta. 2016. Bioenergetic status and oxidative stress during escape response until exhaustion in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 478:16-23.

Romaniello, R., A. Leone, G. Peri. 2015. Measurement of food colour in L*a*b* units from RGB digital image using least squares support vector machine regression. J. Agr. Eng. XLVI(482): 138-143.

Salaenoi, J., P. Srimeetian, M. Mingmuang. 2014. Variations of Catalase and Glutathione Activities in Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata*). Kasetsart J. (Nat. Sci.), 48:64-71.

Salem H., A.M. Youssef, A.M.N. El-Nakkadi, D.A. Jones. 1970. Proteolytic decomposition of shellfish proteins under different conditions. Alex J. Agr. Res. 18:61–66.

Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. L. Moullac, C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture, 198:13-28.

Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán, G. Yepiz-Plascencia. 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.

Sanjuás, M. R. 2012. Aplicación se sistemas avanzados para la mejora de la calidad de productos marinos refrigerados de interés comercial. Tesis doctoral. Compostela España. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. 235p.

Santos, E. A., R. Keller, E. Rodriguez, L. Lopez. 2001. Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. Braz. J. Med. Biol. Res. 34:75-80.

Sarower, M. G., A. F. Hasanuzzaman, B. Biswas, H. Abe. 2012. Taste producing components in fish and fisheries products: A review. Intl. J. of Food. Ferment. Technol. 2(2):113-121.

Schäfer G., H. S. Penefsky. 2008. Bioenergetics: Energy Conservation and Conversion. Springer-Verlag. Germany. 312p.

Schubring, R. 2009. Colour measurement. En: Rehbein H., J. Oehlenschläger (eds.). Fishery Products: Quality, safety and authenticity. Edotorial Blackwell-Wiley. Primera edición. U.S.A. pp 127-159.

Sedlmeier, D. 1988. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) releases amylase from the crayfish midgut gland. Regulatory Peptides, 20(2):91-98.

Shahidi, F. 1998. Indicators for evaluation of lipid oxidation and off-flavor development in food. En: E. T. Contis, C. T. Ho, C. J. Mussinan, T. H. Parliament, F. Shhidi, A. M. Spanier (eds.). Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences. Proceedings of the 9th

International Flavor Conference The George Charalambous Memorial Symposium. Developments in Food Science. 40, pp. 55-68. Elsevier Science.

Sigholt T., U. Erikson, T. Rustad, S. Johansen, T.S. nordtvedt, A. Seland. 1997.Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). Journal of Food Science, 62(4): 898-905.

Sikorski Z. E., A. Kolakowska, J. R. Burt. 1990. Posharvest Biochemical and Microbial Changes. En: Sikorski Z. E. Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation. Editorial CRC Press, pp. 55-76.

Sikorski, Z. E., E Kolákowski. 2000. Endogenous Enzyme Activity and Seafood Quality: Influence of Chilling, Freezing, and Other Environmental Factors. En: Haard N. F., Simpson B. K. Ed. (eds.). Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality. Editorial Board. Primera edición. New York. pp 451-488.

Sheehan, D., A. Power. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 123(3):193-199.

Sies, H. 1991. Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes. Klin Wochenschr. 69:965-968.

Simopoulos, A. P. 2008. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. Exp. Biol. Med. 233:674-688.

Söderhäll, K., L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology, 10(1): 23-28.

Spicer, S. S., R. Horn, J. Leppi. 1964. Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. The Connective Tissue. 251-303.

Sriket, C., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura. 2011. Collagenolytic serine protease in fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): Characteristics and its impact on muscle during iced storage. Food Chem. 124:29-35.

Stadtman, E.R., Levine, R.L. 2000. Protein oxidation. Ann. NY Acad. Sci. 899:191-208.

Stern S., D. Cohen. 1982. Oxygen consumption and ammonia excretion during the molt cycle of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 73(3):417-419.

Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. En: Taniguchi, N., J. Gutteridge, (Eds.), Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Oxford University Press, New York, pp 91-95.

Szczesniak, A. S. 2002. Texture is a sensory property. Food Qual. Prefer. 13:215-225.

Szczesniak A. S., M. A. Brandt, H. H. Friedman. 1963. Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. J. of Food Sci. 28(4):397-403.

Szczesniak, A. S., E. L. Kahn. 1971. Consumer awareness of and attitudes to food texture. J. Texture Stud. 2:280-295.

Takeungwongtrakul, S., S. Benjakul, A. H-kittikun. 2012. Lipids from cephalothorax and hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Compositions and deterioration as affected by iced storage. Food Chem. 134:2066-2074.

Tarr, H. L. A. 1966. Post-mortem Changes in Glycogen, Nucleotides, Sugar Phosphates, and Sugars in Fish Muscles–A Review. J. of Food Sci. 31:846-854.

Tejada, M. 2009. ATP-derived products and K-value determination. En: H., Rehbein, J. Oehlenschlager (eds.). Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity pp. 68–88. Chichester, UK: Blackwell.

Teshima, S. 1972. Studies on the sterol metabolism in marine crustaceans. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 21: 69-147

Thébault, M.T., J.P. Raffin, R. Pichon. 1997. The effect of the stimulation regime on *Palaemon serratus* tail muscle energy metabolism. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 116:337-340.

Tian, Z., X. Kang, S. Mu. 2012. The molt stages and the hepatopancreas contents of lipids, glycogen and selected inorganic elements during the molt cycle of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Fish Sci. 78:67–74.

Travis, D. F. 1957. The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. Iv. Post-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. Bio. Bull. 113(3):451-479.

Truchot, J. P. 1980. Lactate Increases the Oxygen Affinity of Crab Hemocyanin. J. Exp. Zoolog. 214:205-208.

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

Veland, J. O., O. J. Torrissen. 1999. The texture of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle as measured instrumentally using TPA and Warner–Brazler shear test. J. Sci. Food Agric. 79:1737-1746.

Viant, M.R., E.S. Rosenblum, R.S. Tjeerdema. 2001. Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B. 765:107-111.

Vijayan, K. K., A. D. Diwan. 1996. Fluctuations in Ca, Mg and P levels in the hemolymph, muscle, midgut gland and exoskeleton during the moult cycle of the Indian white prawn, *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae). Comp. Biochem. Physiol. Part A, 114(1):91-97.

Villamena F. 2013. Chemistry of Reactive Species. En: Villamena F. (eds.). The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. Editorial Wiley. Primera edición. U.S.A. pp 420.

Villarroel, M., G. A. María, C. Sañudo, J. L. Olleta, G. Gebresenbet. 2003. Effect of transport time on sensorial aspects of beef meat quality. Meat Sci. 63(3):53-357.

Vogt, G. 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). Zoomorphology, 114:83-101.

Wagner, B. A., G. R. Buettner, C. P. Burns. 1994. Free radical mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. Biochemistry, 33:4449–4453.

Walton, G. M., G. N. Gill. 1975. Nucleotide regulation of a eukaryotic protein synthesis initiation complex. Biochimica et Biophysica Acta, 390:231-245.

Wang, D., F. Li, C. Yanhong, X. Jianhai. 2012. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. Cell Stress Chaperones. 17(4):423-433.

Wang, W., A. Wang, D. Wang, L. Wang, Y. Liu, R. Sun. 2003. Calcium, phosphorus and adenylate levels and Naq–Kq-ATPaseactivities of prawn*, Macrobrachium nipponense*, during the moult cycle. Comp. Biochem. Physiol. A. 134:297-305.

Wang, W., A. Wang, Y. Liu, J. Xiu, Z. Liu, R. Sun. 2006. Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense.* Aquaculture, 256:624–630.

Wang, Y., L. Liu, J. Zhou, X. Ruan, J. Lin, L. Fu. 2015. Effect of Chitosan Nanoparticle Coatings on the Quality Changes of Postharvest Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, During Storage at 4 °C. Food Bioprocess Tech. 8:907-915.

Wedemeyer, G. A., D. J. Mcleay. 1981. Methods for Determining the Tolerante of Fishes to Environmental Stressors. In Stress and Fish (Pickering, A. D.) Academic Press. London. 247-276.

Wendelaar-Bonga, S. E. 1997. The Stress Response in Fish. Physiological Reviews. 77(3):591-625.

Wilkinson R. J., N. Paton, M. J.R. Porter. 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture 282: 26–32.

Whiteley, N. M., E. W. Taylor. 1990. The acid–base consequences of aerial exposure of the lobster, *Homarus gammarus*, at 10 and 20˚C. J. Therm. Biol. 15:47–56.

Whiteley, N. M., A. J. El Haja. 1997. Regulation of Muscle Gene Expression Over the Moult in Crustacea. Comp. Biochem. Physiol. Part B, 117(3):323-331.

Xiong, Y. L. 1997. Protein Denaturation and Functionality Losses. En: Erickson M. C., Hung Y. C. (eds.). Quality in frozen food. Primera edición. New York: Chapman & Hall. pp 111-140.

Yamagata, M., L. k. Low. 1995. Banana Shrimp, *Penaeus merguiensis*, Quality Changes During Iced and Frozen Storage. J. of Food Sci. 60(4):1750-3841.

Yamaguchi, S., K. Ninomiya. 2000. Umami and Food Palatability. J. Ntr. 921s-926s

Yamaguchi, S., T. Yoshikawa, S. Ikeoa, T. Ninomiya. 1971. Measurement of the relative taste intensity of some L-α-amino acids and 5'-nucleotides. J. Food Sci. 36: 846-849.

Yoshida, Y., A. Umeno M. Shichiri. 2012. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity *in vivo.* J. Clin. Biochem. Nutr. 52(1):916.

Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev. 74:139–162.

Yu, X., X. Zhang, P. Zhang, C. Yu. 2009. Critical swimming speed, tail-flip speed and physiological response to exercise fatigue in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. Part A, 153:120-124.

Zamora-Méndez, S. 2012. Evaluación de las respuestas fisiológicas y estatus energético del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, por efecto de distintos procedimientos de muestreo en cultivo intensivo. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS, México. p. 113.

Zeng, Q. Z., K. A. Thorarinsdottir, G. Olafsdottir. 2005. Quality changes of shrimp (*Pandalus borealis*) stored under different cooling conditions. J. of Food Sci. 70:s459-s466.

Zenteno-Savín, T., E. Cortes-Jacinto, J. P. Vázquez-Medina, H, Villarreal-Colmenares. 2008. Daño oxidativo en tejidos de acociles juveniles (*Cherax quadricarinatus* von Martens,

1868) alimentados con diferentes niveles de proteínas y lípidos. Hidrobiológica, 18(2):147-154.

Zenteno-Savín, T., R. Saldierna, M. Ahuejote-Sandoval. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 142:301-308.

Zhang, B., S. Deng, Q. Wang. 2015. Chemical Changes Related to Loss of Quality in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during Chilled Storage under Slurry Ice Conditions. J. Food Process Preserv. 39:2507-2515.

Zhang, L., Q. Li, J. Lyu, C. Kong, S. Song, Y. Luo. 2017. The impact of stunning methods on stress conditions and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at 4° C during 72 h postmortem. Food Chem., 216:130–137.

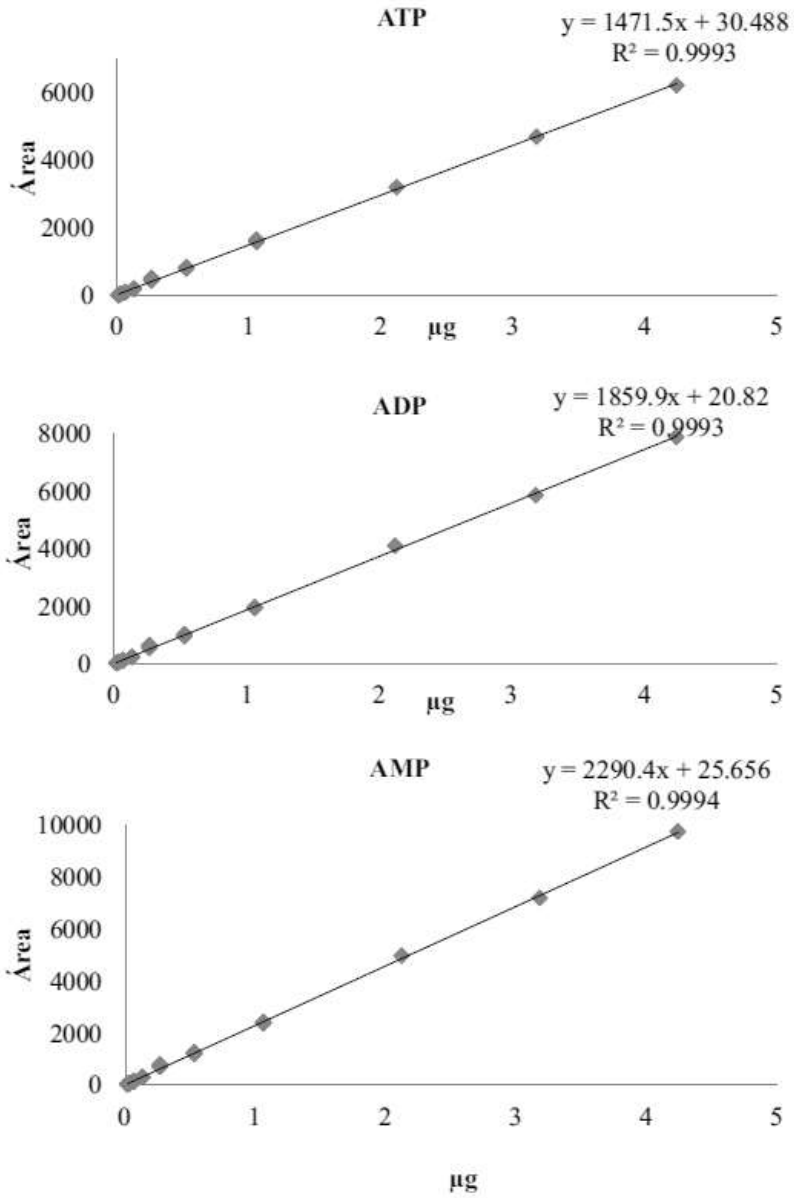
Zhang Q., F. Li, B. Wang, J. Zhang, Y. Liua. 2007. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis: Cloning, distribution and expression. Developmental and Comparative Immunology, 31:429–440.

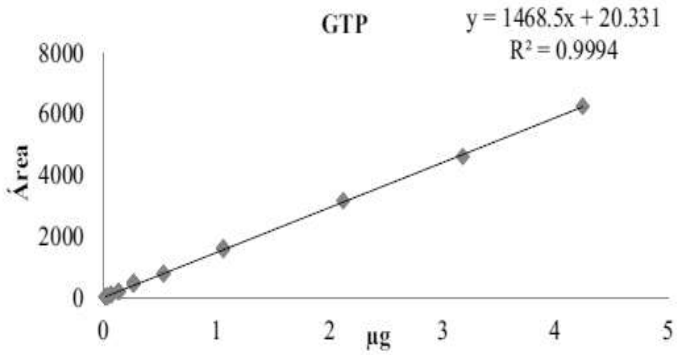
Zhang, Q., F. Li, X. Zhang, B. Dong, J. Zhang, Y. Xie, J. Xiang. 2008. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis. Fish Shellfish Immunol. 24:584-591.

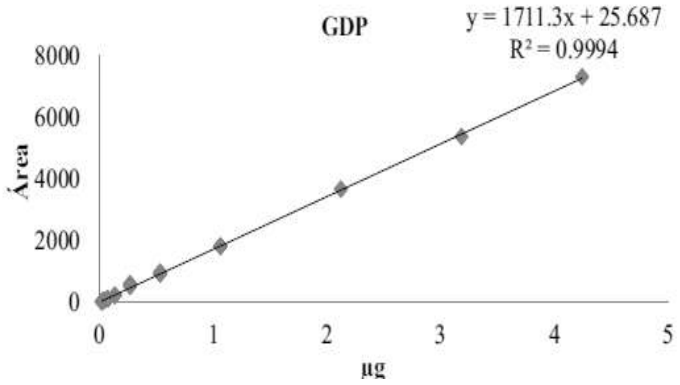
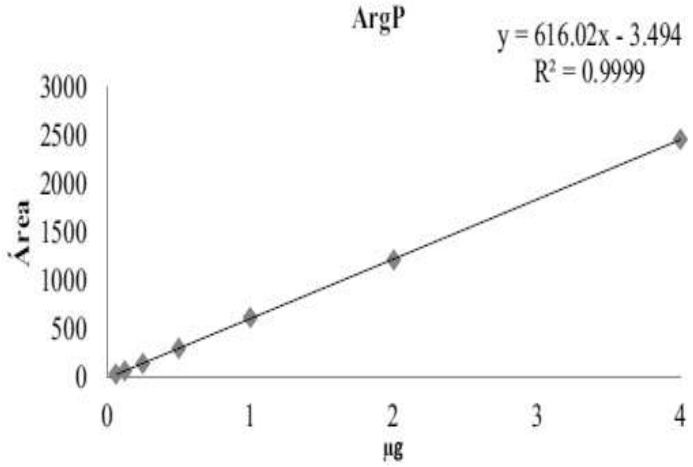
Zhu H., J. Wang, A. Santo, Y. Li. 2013. Downregulation of Antioxidants and Phase 2 Proteins. En: Villamena F. (eds.). The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. Editorial Wiley. Primera edición. U.S.A. pp 420.

11. ANEXOS

Anexo I. Curvas de calibración nde nucleótidos.







Anexo II. Curva de calibración fosfato de arginina.