



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

ESTADO ENERGÉTICO DEL CAMARÓN *Litopenaeus*  
*vannamei* EN LA RESPUESTA DE ESCAPE HASTA UN  
ESTADO DE AGOTAMIENTO

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

**ARLETT ROBLES ROMO**

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2014

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 4 del Mes de Marzo del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**“Estatus energético del camarón *Litopenaeus vannamei* en la respuesta de escape hasta un estado de agotamiento”**


Presentada por el alumno:

**ARLETT ROBLES ROMO**

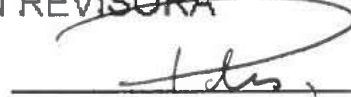
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

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

### LA COMISION REVISORA




DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV  
DIRECTOR DE TESIS



DRA. ELENA PA LACIOS PECHETNOV




DR. FRANCISCO MAGALLÓN BARAJAS  
CO-TUTOR



DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS



DRA. TANIA ZENTENO SAVÍN  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Director de tesis**

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov CIBNOR

### **Co-tutores**

Dra. Elena Palacios Mechetnov CIBNOR

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas CIBNOR

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés UNAM - Campus Sisal

Dra. Tania Zenteno Savín CIBNOR

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés

Dra. Tania Zenteno Savín

## **JURADO DE EXÁMEN DE GRADO**

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés

Dra. Tania Zenteno Savín

## **SUPLENTE**

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dra. Laurence Stephanie Mercier

## RESUMEN

La carga energética adenínica (CEA) [(ATP+0.5ADP)/ATP+ADP+AMP] participa en el control y regulación del metabolismo y se ha utilizado como indicador del estado fisiológico ante diferentes tipos de estrés agudos y crónicos. En peneidos se ha estudiado poco este indicador potencial, por lo que se desconocen aspectos metodológicos para su evaluación, como el mejor método de muestreo de los organismos o de procesamiento del tejido para su análisis. La respuesta de escape en los camarones que se presenta ante la presencia de un potencial predador, incluyendo el ser humano, se caracteriza por una serie de flexiones y extensiones del abdomen, y es soportada principalmente por glucólisis anaerobia y fosfágenos que imponen una alta demanda de energía al organismo.

El objetivo del presente estudio fue analizar los ajustes en el estado energético del camarón *Litopenaeus vannamei* en un estado de agotamiento por la respuesta de escape. En primer lugar, se procedió a la implementación de la metodología para la cuantificación de nucleótidos y fosfágenos por HPLC, lo cual implicó ciertos ajustes metodológicos en relación a la obtención, almacenamiento y procesamiento de las muestras así como en la evaluación del posible uso de anestesia para el muestreo de los camarones. Así, se evaluó el efecto de diferentes procedimientos de muestreo y procesamiento sobre la CEA y los nucleótidos adenílicos totales (NAT): se comparó la congelación del camarón vs la disección a temperatura ambiente, diferentes métodos de enfriamiento para el muestreo, el efecto del tiempo de almacenamiento de muestras a -76°C, el uso de 3 homogenizadores para el procesamiento de tejido, así como el efecto de condiciones de mantenimiento óptimas y sub-óptimas en los organismos. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la anestesia (eugenol) y del estrés por el muestreo mismo sobre CEA, ArgP y variables metabólicas. Para el análisis del estado energético en la respuesta de escape, los camarones fueron estimulados de forma individual para que realizaran una serie de flexiones abdominales hasta el agotamiento, después de lo cual un grupo fue muestreado inmediatamente y otro grupo se dejó en recuperación por una hora. Se evaluaron diferentes indicadores del metabolismo energéticos (nucleótidos, fosfágenos, combustibles y consumo de oxígeno) y del estrés oxidativo (radical  $O_2^{\bullet-}$ , enzimas antioxidantes, e indicadores de daño oxidativo).

Para analizar la CEA en *L. vannamei*, los organismos pueden congelarse en nitrógeno líquido y almacenarse a -76°C hasta por dos años, o bien disectarse en fresco e inmediatamente homogenizar el tejido en ácido; y se descartan otros procedimientos para el muestreo de organismos como el transferencia a agua a 7°C o a una cama de hielo. Se recomienda utilizar el molino mezclador en condiciones criogénicas para el procesamiento de tejido, ya que con éste se obtienen valores mayores de CEA y un menor coeficiente de variación. Se obtuvieron valores óptimos de CEA y ArgP de camarones recién transferidos de estanque, estas variables disminuyeron después de un mes de mantenimiento en condiciones subóptimas y se restablecieron al transferir a los organismos a condiciones óptimas. Es factible obtener hemolinfa de organismos en los que se cuantificará la CEA y ArgP, de preferencia si se anestesian y/o se realiza la sección transversal a partir del primer segmento abdominal.

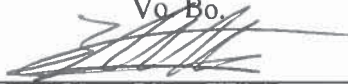
Los organismos alcanzaron un estado de agotamiento después de realizar entre 26 y 29 flexiones del abdomen en 25 s, lo cual disminuyó los niveles de ArgP y CEA en el

músculo, 75% y 18%, respectivamente, y aumentó el nivel de lactato en la hemolinfa y la actividad de GPx en el músculo. La drástica disminución de ArgP previene que la CEA disminuya hasta un punto crítico, y a pesar de que no se observaron cambios en los niveles de glucógeno y lactato del músculo, el aumento de lactato en la hemolinfa sugiere una contribución importante de la glucólisis anaeróbica. El aumento de la actividad de GPx sugiere que el aumento de las especies reactivas de O<sub>2</sub> durante la respuesta de escape se neutralizó adecuadamente ya que no se detectó daño oxidativo, tal como lo indica la ausencia de oxidación de lípidos y proteínas.

Después de una hora de recuperación los niveles de ArgP y CEA en músculo se restablecieron, mientras que el lactato en hemolinfa y la actividad de GPx en músculo se mantuvieron por arriba de lo encontrado en el grupo control, mientras que el MO<sub>2</sub> se restableció al cabo de dos horas de recuperación. La glucosa en hemolinfa aumentó 1.8 veces al cabo de una hora de recuperación, lo que sugiere podría estar relacionada más bien a la reposición de los niveles tanto de ATP como de ArgP mas que a la utilización directa de este combustible durante las contracciones musculares repetidas

Palabras clave: carga energética adenilica, estrés oxidativo, *Litopenaeus vannamei*, metabolismo energético, respuesta de escape

Vo. Bo.



---

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

## ABSTRACT

Adenylic energy charge (AEC)  $[(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)]$  participates in metabolic control and regulation and has been used as an indicator of the physiological state under different conditions of acute and chronic stress. Few studies have been done in penaeid shrimp regarding the potential use of AEC; therefore some methodological questions regarding the best way to sample and process are still unanswered. Shrimp exhibit an escape response through consecutive tail flippings in the presence of a potential predator, including human beings. This response is supported by anaerobic glycolysis and phosphagen breakdown that impose a high energy demand to the organism.

The objective of this work was to analyze the adjustments of the energetic status of the shrimp *Litopenaeus vannamei* during escape response until exhaustion. First, we proceeded to implement the analysis of nucleotides and arginine phosphate (ArgP) by HPLC, which implied pertinent methodological adjustments, regarding sample obtention, storage and processing, as well as possible use of anesthesia for shrimp sampling. The effect of different sampling and processing procedures on the AEC and total adenylic nucleotides (NAT) were measured: liquid nitrogen freezing of shrimp versus dissection at room temperature was compared, different cooling methods for sampling, effects of long-term storage at  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$ , use of three instruments for tissue processing, and effects of optimal and sub-optimal laboratory conditions. In addition, effects of anesthesia (eugenol) and sampling stress per se was analyzed on AEC, ArgP, and metabolic variables. To analyze the energy status of the escape response, shrimp were individually stimulated to elicit a series of abdominal flexions until exhaustion. One group was immediately sampled and another group was allowed to recover for one hour after exhaustion. Different indicators of energy metabolism (adenylic nucleotides, phosphagens, fuels, and oxygen consumption) and oxidative stress (superoxide  $[\text{O}_2^{\cdot-}]$  radical, antioxidant enzymes, and indicators of oxidative damage) were measured.

For the analysis of AEC in *L. vannamei*, shrimp can be frozen in liquid nitrogen and then stored at  $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$  for up to two years or freshly dissected and immediately homogenized in acid; other cooling procedures were discarded. Use of cryogenic ball mill mixing is strongly recommended because higher AEC values and lower variations in coefficient values were obtained. Optimal values of AEC and ArgP were obtained from shrimp that were recently transferred from ponds to indoor tanks, but the values decreased after one month under sub-optimal conditions and improved after transfer to optimal conditions. It is feasible to obtain hemolymph from shrimp in the same organisms used for AEC and ArgP determinations, preferentially if organisms are anesthetized and/or sectioned between the first and second abdominal segment.

We found that shrimp were exhausted after 26–29 tail-flips in 25 s, and this was accompanied by a decrease in abdominal muscle ArgP and AEC by 75% and 18%, respectively; whereas, hemolymph lactate levels and muscle GPx activity increased. The drastic decrease in ArgP prevented a drop of AEC to a critical level. Although no significant changes were observed in glycogen or lactate concentrations in muscle, the increase in levels of hemolymph lactate indicates an important contribution of anaerobic glycolysis. Increase in GPx activity in abdominal muscle suggests an increase in reactive oxygen species during intensive muscular activity, which was adequately

neutralized because no signs of oxidative damage occurred, as indicated by the lack of lipid and protein oxidation.

After a recovery period lasting one hour, levels of AEC and ArgP in muscle were re-established; in contrast to hemolymph lactate and muscle GPx activity, which remained higher during recovery, compared to the control population. Oxygen consumption was re-established after a recovery period of two hours. Hemolymph glucose increased 1.8-fold after a recovery period of one hour, which suggests its involvement in recuperation of levels of ATP and ArgP, rather than the direct use of this fuel during repeated muscular contractions.

**Keywords:** Adenylic energy charge, energy metabolism, escape response, *Litopenaeus vannamei*, oxidative stress

*A María Dolores, Gustavo, Jeaneth, Ariana y Koby*



## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, en especial al área de Posgrado por brindar el espacio y facilidades para el desarrollo del trabajo de tesis, así como por el apoyo brindado para la realización de una estancia.

Al CONACYT por la beca otorgada con número de registro 204062

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”, tanto por el financiamiento para el desarrollo del trabajo como por la beca terminal de Doctorado otorgada.

Al Dr. Ilie Racotta por dirigir este trabajo, así como al comité tutorial Dra. Elena Palacios, Dr. Francisco Magallón, Dra. Martha Gabriela Gaxiola, Dra. Tania Zenteno por sus sugerencias, correcciones y apoyo.

A Olivia Arjona López por su disponibilidad, entusiasmo y 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.

A Orlando Lugo Lugo y Norma Olgún Monroy por el apoyo brindado para los análisis de estrés oxidativo en el Laboratorio de Salud ambiental y Biomedicina.

A 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.

A Carlos Ernesto Ceseña por el apoyo brindado para la realización de los bioensayos en el Laboratorio de Maduración y Reproducción de Crustáceos.

A Rosa Linda Salgado García por el entrenamiento para realizar la medición del consumo de oxígeno, a la Dra. María Teresa Sicard y a Gilberto González Soriano y por facilitar el uso de la cámara de refrigeración del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos

A la Dra. Lucía Ocampo Victoria por el apoyo y asesoría brindados para la evaluación del consumo de oxígeno y a Mónica Reza Sánchez el apoyo técnico para la cuantificación de amonio en el Laboratorio de Respiración

A Sandra De La Paz Reyes por brindar asesoría técnica con respecto al mantenimiento de los camarones y facilitar el uso de espacio en el Laboratorio de Nutrición experimental para el mantenimiento de los organismos.

Pablo Monsalvo Spencer por el apoyo y asesoría en el manejo de sistemas acuícolas  
Aclimatación y Mantenimiento de organismos acuáticos

Mayra de La Paz y Jesús Aguilar por facilitar la obtención de camarones de los estanques del CIBNOR.

Dr. Roberto Civera Cerecedo por el apoyo para la realización de algunos experimentos.

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.

Al posgrado de la Unidad académica de la UNAM campus Sisal, por facilitar la realización de una estancia de entrenamiento técnico.

Al Dr. Gerard Cuzón por el entrenamiento otorgado sobre la muda de los camarones.

A todos los compañeros del laboratorio de Metabolismo de Lípidos, en especial a Miguel Regalado, Saúl Zamora, Bryan Licon, Ariadna Sánchez, y a Nannie Esperanza Nivón, quienes brindaron apoyo para la realización de parte del trabajo experimental.

A Rodolfo Garza por el constante apoyo para la realización de este trabajo.

A mi familia por el ánimo, motivación, y apoyo.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	i
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	vi
CONTENIDO .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS .....	xiii
1 INTRODUCCIÓN .....	15
2 ANTECEDENTES .....	16
2.1 Estado energético celular: concepto de carga energética adenílica .....	16
2.2 Respuesta de escape.....	23
2.2.1 Características generales.....	23
2.2.2 Aspectos metabólicos .....	25
2.3 Aspectos metodológicos que afectan los niveles de nucleótidos y fosfágenos ....	29
2.3.1 Obtención, almacenamiento y procesamiento de muestras .....	29
2.3.2. Uso de anestesia durante el muestreo .....	31
3 JUSTIFICACIÓN .....	32
4. OBJETIVOS .....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos particulares .....	33
5 HIPÓTESIS .....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
6.1. Diseño experimental y obtención de muestras .....	34
6.1.1 Estandarización de condiciones de obtención y de procesamiento de muestras para la cuantificación de carga energética adenílica y niveles de arginin fosfato en camarón.....	34
6.1.1.1. Comparación de la congelación con nitrógeno líquido y la disección rápida a temperatura ambiente.....	34
6.1.1.2. Efecto de los diferentes métodos de enfriamiento durante el muestreo de los organismos .....	35
6.1.1.3 Almacenamiento prolongado de organismos a -76°C .....	35
6.1.1.4 Diferentes métodos de homogenización para el procesamiento de músculo de camarón .....	36
6.1.1.5 Condiciones de aclimatación en el laboratorio .....	36
6.1.1.6 Uso de anestesia durante el muestreo .....	37
6.1.1.7 Efecto de la obtención de hemolinfa.....	38

6.1.2 Evaluación del estado energético y del estrés oxidativo en la respuesta de escape.....	39
6.1.2.1 Bioensayo para la respuesta bioquímica (carga energética adenílica, arginin fosfato, reservas y combustibles, e indicadores de estrés oxidativo) .....	39
6.1.2.1.1. Organismos y condiciones de laboratorio.....	39
6.1.2.1.2 Organismos utilizados para la medición de nucleótidos y arginin fosfato .....	39
6.1.2.1.3. Organismos utilizados para el análisis de la composición bioquímica e indicadores de estrés oxidativo .....	41
6.1.2.2. Bioensayo para evaluar el consumo de O <sub>2</sub> posterior a la respuesta de escape.....	41
6.1.2.2.1. Organismos y condiciones de laboratorio.....	41
6.1.2.2.2. Medición del consumo de O <sub>2</sub> .....	43
6.2 Métodos analíticos .....	43
6.2.1 Cuantificación de nucleótidos y fosfágenos .....	43
6.2.1.1 Obtención y procesamiento de muestras. Extracción de nucleótidos .....	43
6.2.1.2 Condiciones de cromatografía líquida de alta presión para la cuantificación de nucleótidos (ATP, ADP, AMP e IMP).....	44
6.2.1.3 Condiciones de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la cuantificación de arginin fosfato.....	45
6.2.2 Reservas, combustibles y metabolitos .....	46
6.2.3 Indicadores de estrés oxidativo.....	48
6.2.3.1 Actividad de enzimas antioxidantes .....	48
6.2.3.1.1 Superóxido dismutasa .....	49
6.2.3.1.2 Glutación peroxidasa selenio dependiente .....	49
6.2.3.1.3 Catalasa.....	49
6.2.3.2 Producción endógena de radical superóxido .....	50
6.2.3.3 Peroxidación lipídica .....	50
6.2.3.4 Carbonilos proteicos .....	51
6.2.3.5 Proteínas totales .....	51
6.3. Análisis estadístico .....	51
7. RESULTADOS .....	53
7. 1 Estandarización de la obtención y del procesamiento de muestras para la cuantificación de la carga energética adenílica y los niveles de arginin fosfato en camarón.....	53
7.1.1 Comparación de la congelación con nitrógeno líquido y la disección rápida a temperatura ambiente.....	53

7.1.2. Efecto de los diferentes métodos de enfriamiento de los organismos para su muestreo.....	53
7.1.3 Efecto del almacenamiento prolongado a -76°C en la concentración de los diferentes nucleótidos y de la carga energética adenílica .....	54
7.1.4 Diferentes métodos de homogenización para el procesamiento de tejido .....	55
7.1.5 Condiciones óptimas de los organismos para la obtención de muestras .....	56
7.1.5.1 Condiciones de aclimatación en el laboratorio .....	56
7.1.5.2 Uso de anestesia durante el muestreo .....	56
7.1.5.3 Efecto de la extracción de hemolinfa durante el muestreo .....	62
7.2 Evaluación del estado energético y del estrés oxidativo en la respuesta de escape .....	64
7.2.1 Respuesta de comportamiento .....	64
7.2.2 Metabolismo energético durante la respuesta de escape .....	65
7.2.3 Estrés oxidativo.....	70
7.3 Evaluación del consumo de O <sub>2</sub> posterior a la respuesta de escape .....	72
8. DISCUSIÓN .....	74
8. 1 Estandarización de la obtención y del procesamiento de muestras para la cuantificación de la carga energética adenílica y los niveles de ArgP en camarón....	74
8.1.1 Comparación de la congelación con nitrógeno líquido y la disección rápida a temperatura ambiente.....	74
8.1.2 Efecto de los diferentes métodos enfriamiento de los organismos para su muestreo.....	75
8.1.3 Efecto del almacenamiento prolongado a -76°C en la concentración de los diferentes nucleótidos y en la carga energética adenílica en <i>L. vannamei</i> .....	78
8.1.4 Diferentes métodos de homogenización para el procesamiento de tejido .....	79
8.1.5 Condiciones óptimas de los organismos para la obtención de muestras .....	81
8.1.5.1 Condiciones de aclimatación en el laboratorio .....	81
8.1.5.2 Evaluación del uso de anestesia durante el muestreo .....	83
8.1.5.3 Efecto de la extracción de hemolinfa.....	86
8.2 Evaluación del estado energético y del estrés oxidativo en la respuesta de escape .....	87
8.2.1 Respuesta de comportamiento .....	87
8.2.2 Metabolismo energético durante la respuesta de escape .....	88
8.2.3 Recuperación del estado energético.....	91
8.2.4 Estrés oxidativo.....	92
8.3 Evaluación del consumo de O <sub>2</sub> posterior a la respuesta de escape .....	96
9. CONCLUSIONES .....	100
10. LITERATURA CITADA .....	101

ANEXO I. Efecto de la concentración de metanol en la fase móvil sobre los tiempos de retención de estándares de nucleótidos de adenina.....	113
ANEXO II. Curvas de calibración de nucleótidos.....	114
ANEXO III. Curva de calibración arginin fosfato.....	116
ANEXO IV. Artículos derivados de la tesis .....	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (A) CEA y (B) ArgP ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> anestesiado entero y con sección en el primer segmento abdominal antes de congelarse para su posterior análisis.....	60
<b>Figura 2.</b> (A) CEA y (B) ArgP ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en reposo, después de flexiones abdominales repetidas hasta un estado de agotamiento por fatiga muscular, y después de una hora de recuperación.....	67
<b>Figura 3.</b> (A) Glucosa y (B) lactato ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) en plasma del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en reposo, después de realizar flexiones abdominales repetidas hasta un estado de agotamiento por fatiga muscular, y después de una hora de recuperación.....	69
<b>Figura 4.</b> Actividad de (A) Glutación peroxidasa (GPx, $\text{mU mg de proteína}^{-1}$ ) y (B) superoóxido dismutasa superóxido dismutasa (SOD, $\text{U mg de proteína}^{-1}$ ) en músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en reposo, después de realizar flexiones abdominales repetidas hasta un estado de agotamiento, y después de una hora de recuperación.....	71
<b>Figura 5.</b> Tasa de consumo de $\text{O}_2$ ( $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> durante un periodo de recuperación después de la respuesta de escape inducida por persecución hasta alcanzar el agotamiento por fatiga muscular.....	73
<b>Figura 6.</b> Curvas de calibración de nucleótidos.....	113
<b>Figura 7.</b> Curva de calibración de arginin fosfato.....	115

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Relación entre condición ambiental, características de los organismos y carga energética adenílica.....	18
<b>Tabla II.</b> Concentración de nucleótidos y fosfágenos en condiciones basales. ....	21
<b>Tabla III.</b> Valores de carga energética adenílica y arginin fosfato en crustáceos en distintas situaciones de estrés u otras condiciones que modifican el estado energético. ....	22
<b>Tabla IV.</b> Comparación del efecto de la actividad física sobre la carga energética adenílica en invertebrados marinos.....	26
<b>Tabla V.</b> Cantidad inyectada (nmoles en 25 µL) de los diferentes nucleótidos. ....	45
<b>Tabla VI.</b> Efecto de la congelación en nitrógeno líquido en la concentración de los nucleótidos de adenina y en la carga energética adenílica de músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	53
<b>Tabla VII.</b> Concentración en músculo de los nucleótidos de adenina, carga energética adenílica y arginin fosfato en el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> expuesto a diferentes condiciones de enfriamiento antes del muestreo.....	54
<b>Tabla VIII.</b> Efecto del almacenamiento prolongado a -76°C en la concentración de los diferentes nucleótidos y de la carga energética adenílica en músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	55
<b>Tabla IX.</b> Concentración de los diferentes nucleótidos de adenina y carga energética adenílica en muestras de músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> ..... procesadas con diferentes equipos. ....	55
<b>Tabla X.</b> Concentración de los diferentes nucleótidos de adenina, carga energética adenílica y arginin fosfato en músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> ..... bajo diferentes condiciones de mantenimiento. ....	56
<b>Tabla XI.</b> Concentración de nucleótidos y carga energética adenílica en el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> anestesiado y disectado antes de su congelación. ....	59
<b>Tabla XII.</b> Variables metabólicas cuantificadas en plasma, hepatopáncreas y músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> anestesiado y seccionado antes de su congelación. ....	62
<b>Tabla XIII.</b> Concentración de los diferentes nucleótidos de adenina, carga energética adenílica y arginin fosfato en el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en los que se tomó muestra de hemolinfa antes de congelarse para su almacenamiento. ....	63
<b>Tabla XIV.</b> Variables metabólicas cuantificadas en hepatopáncreas y músculo del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en los que se tomó muestra de hemolinfa antes de congelarse para su almacenamiento. ....	64
<b>Tabla XV.</b> Concentración de nucleótidos de adenina y carga energética adenílica en músculo y hepatopáncreas en el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en reposo, después de realizar flexiones abdominales hasta un estado de agotamiento por fatiga muscular y después de una hora de recuperación. ....	66



<b>Tabla XVI.</b> Variables metabólicas cuantificadas en plasma, hepatopáncreas y músculo en el camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en reposo, después de realizar flexiones abdominales hasta un estado de agotamiento y después de una hora de recuperación...	68
<b>Tabla XVII.</b> Indicadores de estrés oxidativo en músculo y hepatopáncreas del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> en reposo, después de la respuesta de escape y después de una hora de recuperación. ....	70
<b>Tabla XVIII.</b> Tasa de consumo de O <sub>2</sub> (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) del camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> durante un periodo de recuperación después de la respuesta de escape inducida por persecución hasta alcanzar el agotamiento por fatiga muscular.....	73
<b>Tabla XIX.</b> Efecto de la concentración de metanol en la fase móvil sobre los tiempos de retención de estándares de nucleótidos de adenina.....	112

## 1 INTRODUCCIÓN

La bioenergética estudia de forma cuantitativa los intercambios y transformaciones de materia y energía entre los organismos y su ambiente (Lucas, 1996). El estudio de la bioenergética se aborda desde dos enfoques; el primero a nivel de organismo, en el que se maneja el balance energético, y el segundo desde el punto de vista celular, en el que se estudian los metabolitos, combustibles, enzimas y otras moléculas que permiten el uso o la síntesis de energía.

El estudio de la bioenergética en acuicultura puede aportar información que ayude a solucionar problemas generados por el cultivo mismo y a comprender las estrategias de adaptación de diferentes especies (Lucas, 1996). La premisa en la bioenergética es que en estado estable las células, tejidos, órganos y organismos deben de mantener un equilibrio entre la síntesis y la degradación de ATP (Atkinson, 1968). Dicho equilibrio puede alterarse en algunas situaciones y por ende, representa un indicador de la capacidad de respuesta de un organismo durante procesos normales del ciclo de vida, condiciones ambientales adversas, situaciones de estrés, entre otros. Como ejemplo, distintos indicadores de “calidad”, incluyendo aquellos relacionados con el balance de energía a nivel bioquímico (e.g. carga energética adenilica ó CEA, contenido de carbohidratos y lípidos), fisiológico (e.g. consumo de oxígeno y excreción nitrogenada, índice de condición) y comportamental (respuestas a pruebas de estrés, capacidad de enterrarse) se alteran en respuesta a condiciones de estrés ambiental o por manejo Maguire et al. (1999). En relación a una de las variables más importantes, podemos considerar la CEA, definida por Atkinson (1968) define el concepto de CEA como un índice de la energía celular disponible que se mantiene regulada a partir del control de la actividad enzimática en puntos clave de las rutas metabólicas que producen energía en forma de ATP. Este índice brinda información acerca de la capacidad de regulación de la célula o del sistema (Atkinson, 1968), ya que las variables que componen el índice están involucradas en la transferencia de energía a través de los sistemas enzimáticos catabólicos y anabólicos (Giesy et al., 1988). En el caso particular de camarones peneidos, la homeostasis energética es esencial para llevar a cabo los procesos normales del ciclo de vida o en situaciones impuestas por el cultivo mismo. Dicha homeostasis en

los camarones puede alterarse por factores intrínsecos a la biología del organismo, como el ciclo de muda, y por factores externos, como la respuesta de escape ante la manipulación. Durante esta última, la demanda energética aumenta y como mecanismo de compensación hay un mayor aporte de energía al sistema, lo cual implica una alta utilización de reservas energéticas y que la demanda de oxígeno pueda sea mayor su aporte o que su concentración en los tejidos (Gäde, 1983). En general para crustáceos y en particular para camarones penicidos, no existen estudios integrados donde se analice la CEA en paralelo con procesos relacionados con el suministro y uso de energía. Se conoce poco sobre la utilización de reservas, el manejo de combustibles, la producción o síntesis de metabolitos, el consumo de oxígeno, así como los componentes del metabolismo basal que consumen energía de manera esporádica pero hasta cierto punto frecuente, como por ejemplo la respuesta de escape que provoca una alta demanda energética.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Estado energético celular: concepto de carga energética adenilica**

La energía obtenida a partir de la oxidación de las moléculas orgánicas se conserva como energía química principalmente en forma de adenosin trifosfato (ATP) por lo tanto el ATP tiene un papel central en los estudios bioenergéticos. Una de las características que distinguen al ATP de otras moléculas de alta energía es que todas las reacciones en la célula que provocan la fosforilación del ADP para dar lugar al ATP así como aquellas en las que el grupo fosfato terminal es transferido a aceptores de fosfatos son catalizadas por enzimas, la mayoría de las cuales son específicas para ATP y/o ADP. El ATP es el intermediario universal en las reacciones de la célula que requieren energía, así como en las que la producen (Lehninger, 1965).

Del metabolismo basal aproximadamente 10% del  $O_2$  se consume por reacciones que utilizan  $O_2$  pero que no dan lugar a la síntesis de ATP, y del  $O_2$  presente en las mitocondrias hasta el 20% es consumido por la fuga de protones y (Brookes et al., 1998). Los procesos que en mamíferos consumen la mayor parte del ATP así como el porcentaje que esto representa con respecto al metabolismo basal de todo el organismo: Síntesis de proteína (28%), la bomba de  $Na^+-K^+$  (19-28%), la bomba de  $Ca^{2+}$  (4-8%), la ATPasa de la miosina (2-8%), la gluconeogénesis (7-10%), la ureagénesis (3%), la

síntesis de ARN y recirculación de sustrato (<2% cada una), el resto del metabolismo basal es destinado a otros procesos que consumen ATP, sin embargo la contribución de estos diferentes procesos al metabolismo basal depende de cada tejido (Rolfe y Brown, 1997; Hochachka y Somero, 2002).

El índice del estado energético de la célula, denominado carga energética adenínica (CEA), se obtiene a través de la fórmula 1, y representa la cantidad de energía celular disponible bajo el enlace fosfato del ATP o del ADP en relación a la concentración total de los nucleótidos (Atkinson y Walton, 1967). Debido a que algunas enzimas responden a la concentración individual de ATP, ADP ó AMP y otras a la tasa de la concentración de ATP/ADP ó ATP/AMP, para calcular la CEA se propuso la fórmula 1 en la que se relacionan todos los efectos que ejercen los nucleótidos de adenina a nivel energético en la célula (Atkinson, 1969).

$$CEA = \frac{[ATP] + 0.5[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Fórmula 1. Fórmula para calcular la carga energética adenínica (Atkinson y Fall, 1967). Donde CEA: carga energética adenínica, ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato.

Atkinson (1968) explicó que cuando se tiene un aporte adecuado de sustrato energético y la CEA tiende a disminuir, como mecanismo de compensación aumentará la síntesis de ATP y el estado metabólico permanecería estable. En el caso contrario en que no se cuente con el aporte adecuado de ATP, habrá una disminución de la CEA y un reordenamiento de los procesos que generan y utilizan ATP, con lo cual mantendrá en estado estable la nueva condición metabólica con un menor valor de la CEA. Cuando en determinada reacción no participa un catalizador, el ATP no dona sus grupos fosfato espontáneamente, por lo que sólo a través de enzimas específicas se transfieren los fosfatos del ATP. Esta es una de las razones por las que la célula puede regular la concentración de de ATP a través de la regulación de enzimas (Nelson y Cox, 2001).

La “energía libre” de una reacción varía principalmente en función de la concentración total de los reactantes y los productos (Voet, 2005), entre más lejana al equilibrio esté la reacción del rompimiento de los enlaces fosfoanhídrido del ATP o del ADP, más se favorecerá su rompimiento, lo que permitirá responder a las necesidades de la célula en

determinado momento. Por ello, en estado óptimo las células mantienen la concentración de los nucleótidos y sus productos de hidrólisis lejos del equilibrio y, de esta manera, la concentración de los tres nucleótidos de adenina brinda una idea de que tan lejana está la célula de esa condición óptima o del equilibrio no favorable. El valor máximo de la CEA es 1, para lo cual es necesario que las concentraciones de ADP y AMP sean cercanas a cero y que se tenga el máximo de energía disponible bajo forma de ATP. Según Raffin y Thébault (1996) los invertebrados toleran valores de CEA menores (0.3-0.4) que los vertebrados (0.5-0.6), AMP desaminasa de los primeros tiene una eficiencia menor a la de los segundos. Independientemente de los valores más bajos posibles dependiendo del grupo de organismos, se ha relacionado la CEA con el grado de estrés ambiental al cual están expuestos los organismos, tal como se expone en la Tabla I.

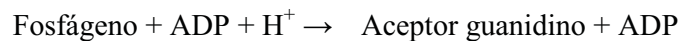
**Tabla I.** Relación entre condición ambiental, características de los organismos y carga energética adenilica.

<b>CEA</b>	<b>Condición ambiental</b>	<b>Característica que se presenta en los organismos</b>
0.8-0.9	No limitante (no-estrés)	Alta tasa reproductiva Viabilidad
0.5-0.75	Limitante (estrés parcial)	Tasa de crecimiento baja o cero No reproducción
~ 0.5	Severamente limitante (estrés severo)	No hay crecimiento No hay reproducción Viabilidad perdida aun después de transferir a los organismos a condiciones no estresantes

Tomado de Ivanovici, 1980.

Otro tipo de moléculas energéticas son los fosfágenos (N-fosforilguanidinas), los cuales son un grupo de moléculas derivadas de la guanidina que están fosforiladas y que participan en reacciones de transferencia de un grupo fosforilo (Ruben et al., 2005). Los fosfágenos donan su grupo fosforilo a una molécula de ADP lo que permite la formación de una molécula de ATP a través de la reacción general se muestra en la fórmula 2 (Ellington, 2001; Ellington, 1991): Se han identificado los siguientes fosfágenos; la arginin fosfato (ArgP) en invertebrados y la creatinina fosfato (CP) en vertebrados, y otros menos comunes como glicociamina fosfato, taurociamina fosfato, hipotaurociamina fosfato, lombricina fosfato, ofelina fosfato y talasemina fosfato reportados en poliquetos. El sistema arginin cinasa /ArgP se ha encontrado en músculo

y en espermatozoides de moluscos y crustáceos, en fotorreceptores de crustáceos y en las branquias de cangrejos, la ArgP se encuentra principalmente en invertebrados aunque se ha encontrado que tanto la CP como la ArgP están presentes en las mismas fibras del erizo de mar. La principal función de los fosfágenos es la de suplementar al ATP especialmente en células de tejidos que tienen tasas de gasto energético altas y variables, como los músculos y las neuronas, entre otros, es por esto que se dice que los fosfágenos funcionan como un amortiguador del ATP (Ellington, 2001).



Fórmula 2. Reacción en la que los fosfágenos transfieren el ATP (Ellington, 2001). Donde ATP: adenosin difosfato, ADP: adenosin difosfato.

Algunos invertebrados solo presentan ArgP, otros presentan ArgP y CP y organismos como los poliquetos presentan hasta siete diferentes fosfágenos, mientras que, en el caso de vertebrados, solo se ha encontrado CP. Como ya se mencionó, entre los invertebrados que presentan las mayores concentraciones de ArgP son los camarones y las langostas, en los músculos del abdomen (Ellington, 2001). Lo cual se relaciona con su actividad de alta intensidad y corta duración que se analiza más adelante. Por otro lado la CEA y la concentración de fosfágenos, entre otros metabolitos energéticos, se utilizan como “índices de frescura” de organismos marinos cultivados o capturados para ser comercializados. Después de capturar a un organismo existe un efecto por la separación de la cabeza del resto del cuerpo que causa que las reservas energéticas se agoten con mayor rapidez (menor calidad del producto) que cuando el organismo se almacena entero (Gornik et al., 2008). El tipo de estrés antemortem y el método de captura tienen efecto sobre la calidad del organismo (producto) (Albalat et al., 2009).

Por lo anterior, la concentración de fosfágenos, aunada a la CEA brinda una idea del estado energético (a nivel de moléculas energéticas disponibles) de un organismo en determinada condición, y por ende un índice de estrés fisiológico que puede utilizarse para el monitoreo continuo de los cultivos (Lucas, 1996).

Las concentraciones de nucleótidos y fosfágenos son muy variables según el organismo, la condición en la que se encuentran, e incluso las metodologías particulares de procesamiento de muestras (lo cual se puede apreciar en la tabla II).

A continuación, se ejemplifican algunas situaciones comunes en las cuales se cuantifica la CEA o la concentración de ArgP como son contaminantes variables; actividad física, entre otras (Tabla III): En el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* la CEA varía en diferentes condiciones como cambios bruscos de temperatura, exposición a sulfitos y el estado nutricional, entre otros (Moal et al., 1991; Li et al., 2007; Le Moullac et al., 2008). En el camarón *Penaeus chinensis*, se realizó un estudio en el que se relacionó la CEA con la condición general del organismo en relación al pH (6, 7, 7.6, 8 y 8.5), dado que se encontró una relación entre la sobrevivencia, los valores de la CEA, la concentración de fósforo y la actividad de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasa; a partir de esa información, se identificó como valor óptimo para el cultivo un pH de 7.6 (Wang et al., 2002). En el camarón *Palaemonetes varians*, en el que se utilizó a la CEA como medida del límite de respuesta ante un estrés ambiental; en este caso se analizó la CEA de organismos expuestos a 0, 0.5 y 3  $\text{mg L}^{-1}$  de amonio por dos semanas; los autores distinguen dos tipos de respuesta, una dosis de 0.5  $\text{mg L}^{-1}$  de amonio no fue letal y provocó disminución de la CEA, mientras que a 3  $\text{mg L}^{-1}$  de amonio encontraron una respuesta variable, que atribuyeron a la letalidad de esa concentración (Marazza et al., 1996). Otros ejemplos de estrés por condiciones ambientales se encuentran en los trabajos realizados con los camarones *Marsupenaeus japonicus* y *Lepidophthalmus louisianensi* expuestos a condiciones de hipoxia y anoxia, respectivamente: se encontró una disminución de la ArgP sin cambios en la CEA en los organismos control (Abe et al., 2007; Hand y Hollman, 2009). El estrés causado por la respuesta de escape, hasta el agotamiento por fatiga en el cangrejo *Crangon crangon*, disminuyó la concentración de la ArgP así como de la CEA (Onnen y Zebe, 1983), lo cual se analiza más a detalle en la siguiente sección.

**Tabla II.** Concentración de nucleótidos y fosfógenos en condiciones basales.

<b>Organismo-tejido</b>	<b>ATP</b>	<b>ADP</b>	<b>AMP</b>	<b>ArgP</b>	<b>Tejido</b>	<b>Referencia</b>
Rata						1
Hepatocitos	3.38	1.32	0.29			
Miocitos	8.05	0.93	0.04	28.0*		
Neuronas	2.59	0.73	0.06	4.70*		
Humano eritrocitos	2.25	0.25	0.02	0*		1
<i>Escherichia coli</i>	7.90	1.04	0.82	0*		1
Cangrejo rojo de la isla navidad <i>Gecarcoidea</i> <i>natalis</i>	4.80	0.90	0.20	36.5		2
Cangrejo azul <i>Callinectes</i> <i>sapidus</i>	5.7	1.15	0.20	29.6	P	3
Langosta espinosa japonesa <i>Panulirus japonicus</i>	8.90			32	M	4
Langosta del Cabo <i>Jasus</i> <i>lalandii</i>	6.40			26	M	4
Langosta americana <i>Homarus americanus</i>	6.50			34	M	4
Langosta de Noruega <i>Nephrops norvegicus</i>	3.53	0.92	0.24	38.5	M	5
Langosta del sur <i>Jasus</i> <i>edwardsii</i>	5.14	0.75	0	10.2	Pe	6
	8.66	0.88	0	44.3	M	6
<i>Cherax destructor</i>	5.64	1.12	0.20	24.0	M	7
Camarón fantasma <i>Lepidophthalmus</i> <i>louisianensis</i>	76.60	7.85	0.63	8.0	OE	8
Camarón japonés <i>Marsupenaeus japonicus</i>	8.30	0.4	0.10	31.0	M	9
	1.50	1.0	0.4	8.50	H	
Camarón chino <i>Penaeus</i> <i>chinensis</i>	6.31	2.20	1.30		M	10
Almeja atlántica de fondo <i>Placopecten magellanicus</i>	3.75	0.27	0.08	25.0	MA	11

Los nucleótidos se expresan en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de tejido fresco, a excepción de los datos de vertebrados y microorganismos que se expresan en mM. .\*Creatinin fosfato

M: músculo abdominal; H: hepatopáncreas; P: periópodo; MA: músculo abductor; OE: organismo entero; Pe: periópodo; **Referencias:** 1: Nelson y Cox, 2001; 2: Morris et al., 2002; 3: Thibodeaux et al., 2009; 4: Shimada et al., 2000; 5: Gornik et al., 2008; 6: Speed et al., 2001; 7: Morris et al., 2005; 8: Holman y Hand 2009; 9: Abe et al., 2007; 10: Wang et al., 2002; 11: Pérez et al., 2008



**Tabla III.** Valores de carga energética adenilica y arginin fosfato en crustáceos en distintas situaciones de estrés u otras condiciones que modifican el estado energético.

Tipo estrés	CEA		ArgP ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )		Referencia
	Basal <sup>1</sup>	Estrés	Basal <sup>1</sup>	Estrés	
Exposición a amonio (0.5-3 mg L <sup>-1</sup> , 96 h)	0.74	0.38*			1
Exposición a amonio (0.5 mg L <sup>-1</sup> , 336 h)	0.63	0.36*			1
Exposición a amonio (3 mg L <sup>-1</sup> , 336 h)	0.63	0.66			1
Hipoxia (1.3kPa) y exposición a Plomo (0.5 mg L <sup>-1</sup> , 14 días)	0.88	0.71*	32	25.80	2
Exposición a cadmio (30 $\mu\text{g L}^{-1}$ , 1 día)	0.85	0.45*			3a
Exposición a cadmio (30 $\mu\text{g L}^{-1}$ , 14 días)	0.92	0.45*			3b
Contaminación por metales pesados (Cu, Cd, Zn y Fe)	0.97	0.95			4
Exposición a sulfitos (>20 $\mu\text{M}$ , 2-4 días)	0.81	0.76*			5
Temperatura: 15-20 vs 32°C	0.84	0.67*			6
Hipoxia (1.3 kPa, 3 h)	0.82	0.77			7
Hipoxia (1.3-1.7 mg L <sup>-1</sup> , 6 h)	0.97	0.84	31.0	6.10*	8
Anoxia	0.94	0.82	20.80	11.40	9
Exposición a aire (24 h, 12°C)	0.98	0.23*			10a
Exposición a aire (24 h, 12°C)	0.97	0.98			10b
RE (60 flexiones abdominales)	0.93	0.67*	24.90	0.50*	11
RE (120 flexiones abdominales)	0.86	0.56*	104.0 <sup>2</sup>	10.80 <sup>2*</sup>	12
RE (30 flexiones abdominales)	0.94	0.90	20.80	10.80*	9
RE (60 flexiones abdominales)	0.94	0.79*	20.8	5.80	9
RE (verano, 45 contracciones)	0.91	0.5*	0.39 <sup>2</sup>	0.2 <sup>2</sup>	13
RE (invierno, 25 contracciones)	0.88	0.44*	0.32 <sup>2</sup>	0.19 <sup>2</sup>	13
Estimulación eléctrica (>15 s, hasta agotamiento)			6.401	2.50	14a
RE (37-47 contracciones, 20 s)	0.92	0.53*	3.1	5.1	14b
Ayuno (45 días)	0.89	0.92	0.42 <sup>2</sup>	0.11 <sup>2*</sup>	15
Nivel trófico alto vs bajo por densidad y estación del año	0.90	0.52*			17
Intermuda vs posmuda/premuda	0.68	0.89			18

<sup>1</sup> control simultáneo; <sup>2</sup>en unidades relativas de fosfato inorgánico; \*estadísticamente diferente al control; CEA: carga energética adenilica; ArgP: arginin fosfato;

**Referencias :** **Ecotoxicología** 1: Marazza et al., 1996 (*Palaemonetes varians*); 2: Morris et al., 2005 (*Cherax destructor*); 3: Giesy et al., 1981 (a: *Palaemonetes paludosis*; b: *Procambarus pubescens*); 4: Harris y Santos, 2000 (*Ucides cordatus* y *Callinectes sapidus*); 5: Le Moullac et al., 2008 (*Crassostrea gigas*); **Respuesta ambiental** 6: Wang et al., 2006 (*Macrobrachium nipponense*); 7: Morris y Callaghan,

1998 (*Cherax destructor*); 8: Abe et al., 2007 (*Marsupenaeus japonicus*); 9: Gäde, 1984 (*Orconectes limosus*); 10: Paterson, 1993 (a: *Penaeus monodon*; b: *Penaeus japonicus*)  
**Actividad muscular, e.g. Respuesta de escape (RE)** 11: England y Baldwin, 1983 (*Cherax destructor*); 12: Onnen y Zebe, 1983 (*Crangon crangon*); 13: Thébault y Raffin, 1991 (*Palaemon serratus*); 14: Thébault et al., 1994 (a: *Palaemon serratus*; b: *Palaemon elegans*); 15: Thébault et al., 1997 (*Palaemon serratus*); **Varios**  
 16: Dickson y Giesy, 1982 (*Procambarus clarkii* y *Orconectes inermis inermis*);  
 17: Moal et al., 1991 (*Crassostrea gigas*); 18: Wang et al., 2003 (*Macrobrachium nipponense*).

## 2.2 Respuesta de escape

### 2.2.1 Características generales

La respuesta de escape es reconocida como un pico de actividad muscular, lo cual conlleva una alta utilización de energía (ATP) que debe de ser producida a una tasa igualmente rápida, a partir de diferentes recursos o rutas metabólicas las cuales pueden variar en función del tipo de actividad máxima o de la especie. Las principales rutas que suplen la energía para este tipo de actividad física son las mismas en el músculo de diferente Phyla como moluscos, artrópodos y vertebrados, estas son la degradación de fosfágenos y la glucólisis anaerobia (England y Baldwin, 1983; Onnen y Zebe, 1983; Gäde, 1984).

La interacción depredador-presa, la captura de alimento, y el comportamiento reproductivo entre otros aspectos dependen en gran medida de la capacidad de locomoción del organismo (Zhang et al., 2006). Los crustáceos de la clase Malacostraca como las langostas, los langostinos y los camarones realizan la locomoción de tres formas: el nado, caminando y mediante flexiones de músculo abdominal (coletazos o en inglés "tail-flip"). La flexión del abdomen se produce como respuesta de escape y durante encuentros agonísticos donde el objetivo principal es disminuir la posibilidad de ser capturado por un depredador (Arnott et al., 1998; 1999). Además se puede presentar durante el proceso de muda o para deshacerse de alimento mantenido en sus estructuras durante la alimentación, entre otros (Wine y Krasne, 1972; Dehn et al., 1985).

El control neuronal de la contracción abdominal se ha estudiado ampliamente en los langostinos, principalmente en *Procambarus clarkii*. El circuito neuronal por el que se produce este escape es generado por un estímulo abrupto que puede ser visual o mecánico y en cada caso participa un par bilateral de neuronas de comando diferente (por medio de axones gigantes o MG y axones laterales gigantes o LG) que sólo difieren

en la dirección en la que se produce el escape. En estos circuitos participan fibras gigantes (GF) que funcionan como neuronas de comando, las que a su vez reclutan motoneuronas de rápida flexión (FF). Al activarse las GF se activan acciones no motoras, lo que habla de la sofisticación necesaria en los circuitos neuronales. Un ejemplo es la inhibición de los receptores encargados del estiramiento del músculo extensor, esto evita que los reflejos de resistencia interfieran con la flexión del escape. Cuando el abdomen está completamente flexionado la inhibición antes mencionada cesa y el abdomen puede estirarse de nuevo. Otro proceso activado por GF es la inhibición (de alimentación adelantada y recurrente) a otras GF y a motoneuronas gigantes (MoG); esto permite que no haya acciones que compitan con el escape y así este pueda ocurrir sin interrupciones (Edwards et al., 1999).

La respuesta de escape se da de tres formas diferentes: Por estímulo táctil al abdomen, en cuyo caso los tres segmentos abdominales se flexionan lo que da como resultado el plegamiento del cuerpo dentro del agua, con un tiempo de respuesta de 10 ms; a la flexión sigue una extensión por reflejo. Esta respuesta es activada o disparada por las interneuronas LG que hacen sinapsis con MoG en los tres primeros segmentos del abdomen y el tórax; los tres segmentos posteriores no reciben la señal de las LG. La segunda forma por la que se da la respuesta de escape ocurre cuando el estímulo llega a través del rostro o del tórax o por un estímulo visual repentino; en estos casos los segmentos abdominales son flexionados provocando que el organismo se mueva directamente hacia atrás, lejos del estímulo, y después ocurre la extensión por reflejo. Esta respuesta es activada por MG las cuales hacen sinapsis con todos los MoG del segmento abdominal pero no con los segmentos torácicos. La tercera forma de respuesta de escape consiste de coletazos repetitivos que siguen al primer coletazo del escape, los cuales no son mediados por neuronas gigantes. Las LG y MG están mielinizadas en camarones y la función de la mielina es la misma que en vertebrados: Incrementar la velocidad de conducción; la velocidad de conducción de los axones gigantes en peneidos es de  $200 \text{ m s}^{-1}$ , la cual es la mayor reportada para cualquier organismo (Xu y Terakawa, 1999). Se ha sugerido que la mielina tuvo su origen a partir del clado de los decápodos y que ello pudo haber aumentado la supervivencia de estos organismos (Faulkes, 2008).

### 2.2.2 Aspectos metabólicos

La contracción muscular asociada al nado o la caminata en los crustáceos implica un aumento en la demanda de  $O_2$ , es decir conlleva el incremento del metabolismo aerobio para suplir la energía necesaria (England y Baldwin, 1983). En contraste, la contracción del músculo abdominal es un tipo de actividad física anaeróbica, donde el ATP es producido inicialmente por los fosfágenos y cuando éstos se agotan, se activa el metabolismo anaerobio (England y Baldwin, 1983). Una de las diferencias entre el ejercicio por nado y caminata, y las flexiones del músculo abdominal, es que la restauración de los fosfatos de alta energía y las reservas de  $O_2$  generalmente se llevan a cabo en menos tiempo que la remoción del lactato (Morris y Adamczewska, 2002). Durante el trabajo muscular, el metabolismo anaerobio está limitado por las características de las células del músculo; por ello, algunos de los factores limitantes son el tamaño de las reservas de los fosfágenos y del glucógeno, así como la sensibilidad de los productos del metabolismo anaerobio (England y Baldwin, 1985, Baldwin et al., 1999).

En el molusco *Lima hians* estimulado para que realizara la respuesta de escape hasta el agotamiento la CEA cambió de 0.90 en reposo a 0.82 después de la actividad física (Gäde, 1981). Una intensa actividad física puede impedir que se mantenga estable la CEA. En la almeja *Placopecten magellanicus* estimulada por un depredador para que respondiera con la respuesta de escape mediante contracciones fásicas durante un minuto, disminuyeron tanto la ArgP como la CEA (Pérez et al., 2008); los trabajos realizados con almejas estimuladas hasta fatiga coinciden en que cuando el organismo se lleva hasta el agotamiento disminuye drásticamente la concentración de ArgP y en menor del ATP y la CEA (Pérez et al., 2008). Cuando el cangrejo *Cherax destructor* realizó la respuesta de escape hasta un estado de agotamiento, la CEA del músculo del abdomen disminuyó 28% (England y Baldwin, 1983). En el cangrejo azul *C. sapidus*, después de caminar por 30 min a  $8 \text{ m min}^{-1}$ , la CEA disminuyó 13% debido principalmente al aumento del AMP, se encontró además un aumento de 2.5 veces en el consumo de oxígeno aunque se encontró también que el metabolismo anaerobio aportó energía (Thibodeaux et al., 2009). En el cangrejo rojo *Gecarcoidea natalis*, inducido a regímenes de 2.5 min de caminata y 2.5 min de reposo a una velocidad  $1.05 \text{ m min}^{-1}$  se encontró un valor de CEA de 0.86, mientras que a cuatro minutos de caminata y un

minuto de reposo a una velocidad de  $0.97 \text{ m min}^{-1}$  la CEA fue de 0.85, mientras que en los organismos control la CEA fue 0.90 (Morris y Adamczewskam, 2002). Valores similares de CEA se han encontrado solo en organismos que realizaron actividad muscular extrema, como la contracción muscular hasta fatiga en langostinos (England y Baldwin, 1983) o en camarones (Thébault et al., 1997).

En cangrejos de la especie *Limulus polyphemus* sujetos por el telson se mantuvieron en posición vertical en el agua, lo que provocó que realizaran movimientos natatorios hasta por 240 s, no se encontraron cambios en la CEA, ni en ArgP, por lo que se infirió que el metabolismo anaerobio contribuyó a mantener la CEA (Carlsson y Gäde, 1986).

Al revisar la bibliografía se encontró que el efecto de los tres tipos de locomoción de decápodos, nado, caminata y flexiones del músculo (respuesta de escape), sobre la CEA, dependerá de la intensidad de la actividad física así como del tiempo que se realice. Sin embargo la respuesta de escape debido a su origen es más intensa que el nado y la caminata ya que lo que busca el organismo al tratar de escapar es alejarse la mayor distancia posible en el menor tiempo, mientras que el nado es más eficiente que la caminata en cuanto a la velocidad, por lo que se esperaría también que se utilizaran mayor metabolitos energéticos en el nado con respecto a la caminata (ver tabla IV).

**Tabla IV.** Comparación del efecto de la actividad física sobre la carga energética adeníllica en invertebrados marinos.

<b>Organismo</b>	<b>CEA</b>	<b>Referencia</b>
<b>Caminata</b>		
<i>Callinectes sapidus</i>	↓9%	Thibodeaux et al. (2009)
<i>Gecarcoidea natalis</i>	↓6%	Morris y Adamczewska (2002)
<b>Escape</b>		
<i>Limulus polyphemus</i>	=	Carlsson y Gäde (1986)
<i>Lima hians</i>	↓9%	Gäde (1981)
<i>Placopecten magellanicus</i>	↓3%	Pérez et al. (2008)
<i>O. limosus</i>	↓16%	Gäde (1984)
<i>C. destructor</i>	↓28%	England y Baldwin (1983)
<i>C. crangon</i>	↓35%	Onnen y Zebe (1983)

CEA: carga energética adeníllica

A continuación se presentan estudios relacionados directamente con la respuesta de escape por flexiones del abdomen: Gäde (1984) investigó el efecto de la actividad física (respuesta de escape) hasta fatiga en el metabolismo energético de *Orconectes limosus* con el objeto de conocer los cambios en la concentración de los sustratos energéticos y

metabolitos en el músculo de la cola y en la hemolinfa. Se encontró que la concentración de fosfágenos en el músculo disminuyó rápidamente (la concentración de ArgP disminuyó 50% después de 20 s de actividad física en la cual se cuantificaron 40 flexiones), el lactato aumentó en músculo (1.25 a 6.94  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso húmedo) mientras que la CEA disminuyó de 0.94 a 0.93 después de 64 flexiones del abdomen. Después de una hora de reposo la CEA se restableció, la concentración de los fosfágenos llegó al 70% de la inicial y la concentración de lactato en músculo y hemolinfa fue mayor que al inicio. Así, se encontró que la CEA se mantuvo aún cuando los organismos llegaron hasta la fatiga, y que la ArgP y el metabolismo anaerobio permitieron la obtención de energía durante la serie de flexiones del abdomen.

Onnen y Zebe (1983) estudiaron el metabolismo energético durante actividad física hasta fatiga (120 s) en el camarón *Crangon crangon* y compararon los resultados con organismos en reposo. Los autores encontraron como efecto de la contracción de los músculos de la cola la disminución de aproximadamente 90% de la concentración de ArgP, un aumento del 50% de la concentración de lactato, un aumento de 16.6 veces de la concentración de fructosa-1,6-bifosfato y la CEA disminuyó de 0.86 a 0.56. Durante la recuperación después de la fatiga, se observó que el valor de la CEA regresó a los valores basales de los controles. De igual forma que en el ejemplo anterior, los autores encontraron que el aporte de energía provino tanto de la ArgP como del metabolismo anaerobio; sin embargo, en este caso la CEA si disminuyó.

Yu et al. (2009) encontraron en *M. japonicus* que al realizar flexiones del abdomen como respuesta de escape hasta la fatiga el lactato en plasma fue mayor con respecto al control (361%) e incluso mayores a los presentados en fatiga por nado, aunque el tiempo necesario para que se presente fatiga por nado ( $> 20$  min) fue mayor que la fatiga por la respuesta de escape (aproximadamente 128 s). Lo anterior se atribuyó a la mayor concentración del lactato durante la respuesta de escape lo cual podría inhibir las enzimas glucolíticas por una disminución del pH. En el hepatopáncreas se encontró una disminución del 52 y 31 % de la concentración de glucógeno y de las proteínas totales, respectivamente, y no se encontraron diferencias en la concentración de lactato. En el músculo abdominal la concentración del glucógeno disminuyó 53%, mientras que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la concentración de proteínas totales y de lactato. Tampoco se observó efecto alguno en la concentración de los triglicéridos y

de las proteínas totales del plasma o del músculo, indicando lo anterior a que en dicha condición los organismos no utilizaron ninguna de estas moléculas como fuente de energía. La concentración de la glucosa en hemolinfa aumentó mientras que la concentración del glucógeno en la glándula digestiva y el músculo abdominal disminuyó, lo que se interpretó como la hidrólisis del glucógeno de la glándula digestiva para producir a glucosa y liberarla a la hemolinfa con el fin de ser transportada hacia el musculo para complementar el uso del glucógeno muscular abdominal en respuesta a la actividad física.

Para entender la participación del metabolismo anaerobio durante la actividad muscular intensa, es importante resaltar que la demanda de oxígeno supera la cantidad de oxígeno que puede ser suministrado al tejido a través de los sistemas respiratorio y circulatorio, por lo que se puede desarrollar un estado de hipoxia en el músculo. Esto implica una participación importante del metabolismo anaerobio, fenómeno conocido como anaerobiosis funcional para distinguir de la anaerobiosis ambiental (Gäde, 1983). Después de este tipo de eventos de alta demanda energética o en situaciones de estrés se produce un aumento en el consumo de  $O_2$  posterior al periodo de actividad muscular lo que se conoce como “deuda de oxígeno” (McMahon et al., 1979).

El aumento del metabolismo, que resulta principalmente de la contracción muscular, que ocurre durante la actividad física, puede provocar un aumento de la producción de especies reactivas de  $O_2$ , en función de la intensidad y la duración de la actividad física (Fisher-Wellman y Bloomer, 2009; Allen et al., 2008, Nikolaidis et al., 2012).

Particularmente, la contracción muscular intensa y de corta duración puede provocar estrés oxidativo. Lo anterior se ha reportado en humanos después de realizar actividad física intensa durante un periodo de 30 s, en los que se observó un aumento de la actividad enzimática antioxidante y de la peroxidación lipídica (Groussard et al., 2003; Cuevas et al., 2005). En peces (*Leuciscus cephalus*) se reportó daño oxidativo al ADN después que éstos nadaron a máxima intensidad (Aniagu et al., 2006). En el caso invertebrados existe menos información, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se observó mayor peroxidación lipídica en organismos que realizaron mayor actividad física (Magwere et al., 2006). En el caso de los crustáceos, a la fecha no se tiene conocimiento de estudios relacionados al estrés oxidativo y a la actividad física.

## **2.3 Aspectos metodológicos que afectan los niveles de nucleótidos y fosfágenos**

### **2.3.1 Obtención, almacenamiento y procesamiento de muestras**

A pesar del amplio uso de la CEA en estudios de fisiología comparada de invertebrados marinos, no se han abordado algunas preguntas metodológicas en relación a la mejor forma para realizar el muestreo de organismos y procesar las muestras, o la estabilidad de las muestras durante el almacenamiento a largo plazo. La mayoría de los estudios en moluscos y crustáceos se han realizado congelando las muestras en nitrógeno líquido, pero con las siguientes variantes: Inmersión directa de camarones vivos (Paterson, 1993; Marazza et al., 1996), o inmersión después de un rápido procesamiento, como es la separación del abdomen de los camarones (Wang et al., 2002; Abe et al., 2007), ostiones enteros pero después de retirarlos rápidamente de la concha (Moal et al., 1991; Le Moullac et al., 2008), uso de accesorios particulares como tenazas sumergidas en nitrógeno líquido con las que se prensa el músculo de langostinos antes de sumergirlos en nitrógeno líquido (Morris et al., 2005), disección rápida de diferentes tejidos de almejas (Maguire et al., 1999), de decápodos crustáceos (Giesy et al., 1981; Albalat et al., 2009; Gornik et al., 2010) o peces (*Sparus aurata*, *Merluccius merluccius*, *Lophius piscatorius*, *Helicolenus dactylopterus*) antes de congelarse (Mendes et al., 2001).

Los procedimientos que utilizan la congelación por inmersión en nitrógeno líquido durante el muestreo tienen la ventaja de detener las reacciones posteriores durante el muestreo de los tejidos. Sin embargo, al analizar cerebros de ratón inmersos en nitrógeno líquido, los resultados muestran cambios en la concentración de nucleótidos, incluso si se realizó la inmersión del ratón entero en nitrógeno líquido, probablemente debido a la inducción de hipoxia arterial antes de que los tejidos se congelaran (Pontén et al., 1973). La inmersión de rebanadas de cerebro de rata en nitrógeno líquido resultó en valores menores de CEA en comparación a rebanadas de cerebro que se perfundieron con solución salina, aunque dichas diferencias se atribuyeron al inadecuado procesamiento del polvo de tejido que se obtuvo por congelación con nitrógeno líquido debido a la reactivación de las enzimas durante la descongelación y antes de que se realizara la precipitación de las proteínas (zur Nedden et al., 2009). Por lo tanto, la utilización de nitrógeno líquido debe de validarse para muestras específicas y el procesamiento mecánico posterior también debería de ser evaluado.



Los métodos de procesamiento varían en diferentes estudios, pero para tejidos con una consistencia como la del músculo generalmente se muele el tejido congelado bajo condiciones criogénicas en morteros de cerámica (Wang et al., 1994; Morris et al., 2005), molinos de acero (Ivanovici, 1980b; Giesy et al., 1981), y con un molino mezclador (Danguomeau) (Moal et al., 1991; Le Moullac et al., 2008). En algunos estudios, el tejido se homogeniza directamente en una solución ácida fría con el uso de diferentes equipos mecánicos, como una mezcladora Waring (Paterson, 1993), un Polytron® (Mendes et al., 2001) u homogenizadores Ultra-Turrax (Raffin and Thébault, 1991; Gornik et al., 2008). Sin embargo, prácticamente no existen estudios que de manera sistemática comparen los métodos para el procesamiento de las muestras para el análisis de la CEA. Una comparación arrojó que el procesamiento con Potter resulta en una menor estabilidad a lo largo de dos horas (ATP disminuyó 7%) del extracto neutralizado en comparación con el tejido que fue molido utilizando el molino mezclador Danguomeau (el ATP se mantuvo estable) (Moal et al., 1989). En peces (salmón del Atlántico y trucha arcoíris), la maceración del músculo en hielo resultó en una concentración de ATP mucho menor (98% para las dos especies) a la obtenida en muestras molidas en un mortero enfriado con nitrógeno líquido o hielo seco, hasta obtener un polvo fino (Thomas et al., 2000).

La estabilidad de los nucleótidos durante el almacenamiento a largo plazo de las muestras es un aspecto crítico dado que es común que transcurran varios meses entre el muestreo y el análisis por cuestiones operativas diversas. Si bien no se encontró variación de los nucleótidos adenílicos en extractos neutralizados libres de proteínas almacenados a -20°C por cuatro meses (Moal et al., 1989); no se ha analizado aún el almacenamiento de tejidos no procesados u organismos completos almacenados a -70°C. Las condiciones basales bajo las cuales los organismos son muestreados y la manera en la que son capturados es clave para evitar producir en los organismos una respuesta de estrés que pudiera cambiar o afectar el balance energético y producir una variación no controlada. Por lo anterior, deberían de establecerse condiciones óptimas de mantenimiento y de captura de los organismos bajo condiciones silvestres, en cultivo o en laboratorios experimentales para obtener valores basales o de referencia de los nucleótidos adenílicos y ArgP.

### 2.3.2. Uso de anestesia durante el muestreo

En general, la manipulación de organismos acuáticos conlleva la imposición de cierto estrés. El uso de anestésicos en crustáceos se ha investigado por su utilidad en la acuicultura, particularmente durante el transporte para la comercialización; pero también por su utilidad para facilitar algunas prácticas de manejo en el laboratorio, como la realización de biometrías, determinación del estadio de muda o del sexo, extracción de hemolinfa, o la disección de tejidos. Para ello se debe de manipular a los organismos y en especial en los camarones decápodos, se puede producir la respuesta de escape, la cual es casi inherente al muestreo de camarones, pero afecta el estudio de variables metabólicas dado el consumo de energía que se requiere para mantener esta respuesta, que de no controlarse puede afectar la interpretación de los resultados. El efecto deseado de la anestesia es una pérdida reversible y generalizada de percepción sensorial (Ross et al., 2007). Al utilizar un anestésico en particular se recomienda validar su uso en procedimientos que normalmente producen estrés en los organismos: lo deseable es que mitigue o retarde algunos de los efectos normales de dicho estrés; pero también puede inducir reacciones de estrés u otros efectos secundarios (Ross y Ross, 2008). La anestesia puede ser aplicada por métodos físicos o químicos: dentro de los físicos se encuentra la disminución de la temperatura, y dentro de los químicos y muy usado en crustáceos se tiene al eugenol. Se reportó como efectivo el uso de eugenol el camarón *M. japonicus* (Ishioka et al., 1974). El eugenol (2-metoxi-4-2-propenil fenol), induce a la anestesia bloqueando canales de sodio dependiente de voltaje (Cho et al., 2008). Zamora-Méndez (2012) evaluó el uso de eugenol en *L. vannamei*, encontró que el uso de este compuesto en organismos capturados de un estanque de mareas permitió obtener los mayores valores de CEA y ArgP, y la atenuación del aumento de lactato y glucosa en hemolinfa; sin embargo, este último no fue un efecto muy claro, debido a que en dos de los tres días de muestreo se del experimento se obtuvieron valores de lactato y glucosa altos (34 y 49 mg L<sup>-1</sup>) asociados a una condición de estrés, y aunque esto se relacionó a las condiciones (hipoxia) del estanque de esos días, también pueden haber influido el manejo de los organismos por la captura misma, la cual requirió diferente esfuerzo durante los tres días, con base en lo anterior se decidió analizar si la manipulación implícita al muestreo afecta los niveles de

ArgP, si el eugenol permite contrarrestar este efecto y si tiene un efecto sobre los combustibles y reservas de otros tejidos.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Los índices fisiológicos en camarones han sido usados con anterioridad para evaluar el estado de salud y estrés y así, mejorar sus condiciones de manejo y cultivo. Algunos índices fisiológicos de camarones anteriormente propuestos, como los niveles de glucosa y lactato en plasma, se han utilizado ampliamente para evaluar la condición de los organismos ante un estrés crónico o agudo (Racotta y Palacios, 1998; Hall y Van Ham, 1998; Sánchez et al., 2001; Pascual et al., 2003; Mugnier y Justou, 2004; Mercier et al., 2006; Joseph y Philip, 2007; Aparicio-Simón et al., 2010; Aguilar et al., 2012). Un uso similar se le ha dado a los índices que relacionan las reservas bioquímicas tisulares (Palacios et al., 2000). Estos índices pueden ser afectados por otras condiciones del camarón, como es la alimentación. Existen otras condiciones inherentes a los camarones, como la muda y el estado inmune, y la respuesta a factores externos, como el oxígeno y la temperatura, que afectan al camarón pero que no necesariamente se ven reflejados en las reservas bioquímicas, en particular en periodos de tiempo cortos. Sin embargo existe la necesidad de contar con más indicadores del estado general de los camarones. Estos indicadores están relacionados con la demanda energética del organismo que tiene la ventaja de ser una variable que integra múltiples sistemas y reservas del organismo, dando en si un valor generalizado de la capacidad del organismo en mantener su homeostasis. A su vez, la CEA que representa de manera directa el estado energético a nivel celular y por esta razón se ha considerado como un indicador del “bienestar” del organismo (Ivanovici, 1980; Moal et al., 1989). La capacidad de regular la CEA es variable ante diferentes tipos de estrés ambiental aplicados en diversas especies de decápodos marinos (Paterson, 1993; Morris y Callaghan, 1998; Wang et al., 2006; Abe et al., 2007). Sin embargo, las variaciones de, la CEA no están bien documentadas en relación a sus niveles basales para distintos organismos, el procesamiento y almacenamiento de la muestra, y su variación frente a distintas variables ambientales o inherentes al organismo, como la muda. Es necesario generar información que permita su uso como un indicador del estado general del camarón. El estudio de los nucleótidos y fosfágenos presenta una complicación en los

decápodos debido a la respuesta de escape que presentan durante su muestreo, y si bien los estudios aclaran que se toman precauciones para evitar la respuesta de escape por parte de los organismos, hace falta examinar metodologías que minimicen los efectos del muestreo y así se puedan obtener valores realmente basales que sirvan como referencia. Por otra parte, la caracterización de la respuesta de escape de los peneidos podría utilizarse como una forma evaluación general, rápida y práctica del estado general de los camarones en determinadas condiciones. El conocer la demanda energética, como un índice fisiológico de camarones podría permitir tomar decisiones más acertadas para su manejo, tanto en laboratorio como en el cultivo comercial.

#### **4. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

Analizar los ajustes en el estado energético del camarón *L. vannamei* en respuesta al agotamiento por la actividad muscular intensa que ocurre durante la respuesta de escape.

##### **Objetivos particulares**

- Implementar la cuantificación de la CEA y ArgP en camarón.
- Evaluar el estado energético e indicadores de estrés oxidativo en la respuesta de escape hasta agotamiento.
- Evaluar el consumo de O<sub>2</sub> durante la recuperación de la respuesta de escape hasta agotamiento.

#### **5 HIPÓTESIS**

La respuesta de escape hasta el agotamiento en *L. vannamei* provocará un aumento en el consumo de ATP que se compensará con la movilización de reservas y combustibles, así como el aumento de la actividad metabólica que llevará a un aumento de la producción de especies reactivas de O<sub>2</sub> que inducirá a un estado de estrés oxidativo.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Diseño experimental y obtención de muestras**

#### **6.1.1 Estandarización de condiciones de obtención y de procesamiento de muestras para la cuantificación de carga energética adenilica y niveles de arginin fosfato en camarón**

Dependiendo de la prueba, a realizar, se obtuvieron juveniles de *L. vannamei* de tanques de concreto externos (1.5 m<sup>2</sup>) de estanques de mareas (8,000 m<sup>2</sup>) ubicados en el CIBNOR, o bien, de la empresa Gran Mar. En todos los casos, las condiciones generales de mantenimiento de organismos fueron: densidad aproximada de 40 camarones m<sup>-2</sup>, temperatura entre 26 y 28°C, oxígeno disuelto (OD) >4 mg L<sup>-1</sup>, salinidad entre 36 y 39 ups, pH 7.8, concentraciones de amonio por debajo de 1 mg L<sup>-1</sup>, y fotoperiodo natural. Los organismos fueron alimentados con una dieta comercial con 35% de proteína (Camaronina, Purina, Ciudad Obregón, Sonora, México), al 2% de la biomasa en el caso de los estanques y 5% en los tanques de concreto. En los tanques el recambio diario, con el fin de remover las heces y el alimento no digerido, fue del 50%. El peso de los organismos utilizados fue 17±3g. Los camarones de los tanques de concreto se muestrearon en el área de los tanques, mientras que los organismos de los estanques se transportaron al laboratorio donde se aclimataron a las siguientes condiciones: temperatura de 28 ± 1°C, OD >4 mg L<sup>-1</sup>, salinidad 37 ± 2 ups, pH 7.8, concentraciones de amonio por debajo de 1 mg L<sup>-1</sup>, y fotoperiodo natural. Los organismos fueron alimentados con una dieta comercial al 35% de proteína (Camaronina, Purina, Ciudad Obregón, Sonora, México) en dos raciones diarias que constituían en total el 2% de la biomasa. En los tanques, el recambio diario fue del 50% con esto se removieron las heces y el alimento no ingerido.

##### **6.1.1.1. Comparación de la congelación con nitrógeno líquido y la disección rápida a temperatura ambiente**

Los camarones juveniles *L. vannamei* se obtuvieron de los tanques de concreto al exterior (1.5 m<sup>2</sup>) ubicados en las instalaciones del CIBNOR y se trasladaron en cubeta con agua de dichos estanques al laboratorio (en un lapso no mayor de 5 min) donde se sumergieron en el nitrógeno líquido (n=4) o se sacrificaron por la separación del cefalotórax y el primer segmento abdominal por medio de una navaja de metal (n=4). De los organismos de ambos tratamientos se disectó rápidamente (sobre una placa de

metal fría) una porción de músculo del segmento abdominal (150 mg aproximadamente), al cual se le retiró el exoesqueleto (también sobre una placa de metal fría). Las muestras se sumergieron en 1.5 mL de ácido tricloroacético 0.5 M frío (4°C) y se homogenizaron con un homogenizador mecánico de flecha (tipo Polytron®) modelo Tempest IQ2 (The VirTis Company, Gardiner, NY).

#### **6.1.1.2. Efecto de los diferentes métodos de enfriamiento durante el muestreo de los organismos**

Los camarones se obtuvieron de los tanques de concreto mencionados en la sección anterior (ubicados en CIBNOR, 1.5 m<sup>2</sup>) y se muestrearon de cuatro diferentes formas:

(1) Inmersión en nitrógeno líquido de organismos capturados de forma masiva.

Los organismos (n = 11) se capturaron de forma masiva, con una red y, fueron expuestos al aire entre 10 s y 3 min mientras se congelaron con nitrógeno líquido de forma individual.

(2) Inmersión en nitrógeno líquido después de la captura individual.

Los organismos (n = 10) se capturaron de forma individual de los tanques de concreto e inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido.

(3) Organismos muestreados y colocados en agua fría.

Los organismos (n = 8) se capturaron con una red y se transfirieron a un contenedor con agua de mar enfriada con hielo a 7°C donde permanecieron por 15 min. Una vez que transcurrieron los 15 min, los organismos no se realizaban movimientos de ningún tipo, es decir no nadaban ni flexionaban el abdomen, ante la manipulación, por lo cual se asumió que ya estaban muertos o totalmente aletargados. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -76°C hasta su procesamiento y análisis.

(4) Organismos muestreados y colocados en cama de hielo.

Los organismos (n = 9) fueron capturados por medio de una red y se colocaron en un contenedor con hielo, por 15 min; después de los 15 min, algunos organismos todavía respondían a la manipulación por medio de la respuesta de escape. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -76°C hasta su procesamiento.

#### **6.1.1.3 Almacenamiento prolongado de organismos a -76°C**

Organismos mantenidos en tanques de concreto (1.5 m<sup>2</sup>, ubicados en el CIBNOR, n=25) se capturaron individualmente, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron, empaquetados de forma individual en bolsas de plástico, a -76°C. Las muestras de cada

organismo se procesaron después una semana, tres semanas, tres meses, seis meses y 23 meses, analizando en cada periodo un grupo de muestras ( $n = 5$ ).

#### **6.1.1.4 Diferentes métodos de homogenización para el procesamiento de músculo de camarón**

Organismos obtenidos de un estanque supralitoral ubicado en las instalaciones del CIBNOR se transfirieron de forma individual a contenedores de 35 L en el laboratorio. Al día siguiente, se sacrificaron por inmersión en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a  $-76^{\circ}\text{C}$ . Las muestras del primer segmento de músculo abdominal se homogenizaron con tres distintos equipos:

(1) El músculo se pulverizó en condiciones criogénicas (nitrógeno líquido) en un molino mezclador de acero inoxidable (MM400, Retsch, Haan, Alemania) a una frecuencia de  $25\text{ s}^{-1}$  y se almacenó a  $-76^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, aproximadamente 150 mg de músculo pulverizado se homogenizó en 1.5 mL de TCA 0.5 M frío, mediante un homogenizador mecánico de flecha (modelo Tempest IQ2, The VirTis Company, Gardiner, USA) a 3,000 rpm por 30 s ( $n = 6$ ).

(2) Una porción del músculo ( $\sim 150$  mg) se disectó en pequeñas porciones y una vez inmerso en 1.5 mL de TCA frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) se homogenizó directamente con un homogenizador mecánico de flecha (modelo Tempest IQ2) a 10,000 rpm por 30 s ( $n = 6$ ).

(3) Una porción del músculo ( $\sim 150$  mg) se trató como el segundo grupo pero se homogenizó en un homogenizador mecánico de esferas (modelo FastPrep24, MP Biomedicals, Irvine, USA) por 40 s y 40 ciclos a temperatura ambiente.

El extracto crudo obtenido de los tres grupos se centrifugó a 3,000 g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante libre de proteínas se utilizó para la extracción de nucleótidos y ArgP ( $n = 6$ ).

#### **6.1.1.5 Condiciones de aclimatación en el laboratorio**

Debido a que en algunos ensayos y preliminares se obtuvieron valores menores de CEA (que de acuerdo a la literatura indicaban una condición general de estrés) en organismos mantenidos al interior del laboratorio en contenedores de plástico, bajo las condiciones ya descritas en la sección 6.1.1, en comparación a los obtenidos en organismos mantenidos en el exterior en un estanque litoral (Zamora-Méndez, 2012) y en tanques de concreto (sección 6.1.1.2), se realizaron muestreos para comparar entre diferentes

condiciones de aclimatación. En todos los casos, los organismos estuvieron en ayuno por 12 horas para evitar el posible efecto de la última ingesta de alimento.

(1) Camarones obtenidos del estanque de mareas se transfirieron individualmente a un tanque oscuro de 35 L al interior de un laboratorio y fueron muestreados el siguiente día (n = 16).

(2) Camarones obtenidos del estanque de mareas ubicado en las instalaciones del CIBNOR se mantuvieron al interior de un laboratorio por un mes, en tanques de color claro (500 L) a una densidad de 70 camarones  $m^{-2}$  bajo las mismas condiciones mencionadas. Un día antes del muestreo, los organismos se transfirieron individualmente a un tanque oscuro de 35 L (n = 5).

(3) Camarones obtenidos del estanque de mareas fueron mantenidos por un mes en tanques de color claro (500 L) al interior de un laboratorio, posteriormente se transfirieron a un tanque oscuro de 5,000 L al interior del mismo laboratorio donde se mantuvieron por otro mes a una densidad de 20 camarones  $m^{-2}$ , bajo las mismas condiciones ya mencionadas. Una vez transcurrido el mes durante el cual los organismos se mantuvieron en el tanque de 5,000 L éstos se transfirieron de forma individual a un tanque de 35 L un día antes del muestreo (n = 22).

Todos los organismos muestreados se capturaron de forma individual se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a  $-76^{\circ}C$ .

#### **6.1.1.6 Uso de anestesia durante el muestreo**

Los camarones juveniles *L. vannamei* se obtuvieron de la empresa Larvas Gran Mar (La Paz, B.C.S., México), se mantuvieron al interior del laboratorio en un tanque de 7  $m^2$ , en un volumen de agua de 5,000 L, a una densidad de 20 camarones  $m^{-2}$ , bajo condiciones controladas ( $27 \pm 1^{\circ}C$ , aireación permanente,  $> 5.5 \text{ mg L}^{-1}$  de OD, pH 7.8, salinidad de 39 ups, amonio por debajo de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , fotoperiodo artificial 12:12). Se aclimataron por 3 semanas antes de comenzar los muestreos. Los organismos fueron alimentados con una dieta comercial al 35% de proteína (Camaronina, Purina, Ciudad Obregón, Sonora, México), a razón del 2% de su biomasa diariamente, dividida en dos porciones, a las 10:00 y 17:00. Se realizó un recambio diario del 50% de agua contenida en los tanques con lo cual se removieron las heces y el alimento no ingerido.



Durante la tarde y antes de la segunda alimentación (17:00 horas aproximadamente), se seleccionaron organismos en intermuda ( $21.2 \pm 0.34$  g) que se colocaron en unidades tipo jaula (malla de polietileno extruido, 0.26 m de diámetro y 0.19 m de altura) las cuales se encontraban a su vez dentro de tanques con un volumen de 35 L y se dejaron sin disturbios y en ayuno hasta el día siguiente que se muestrearon a las 9:00 horas. Los organismos se asignaron aleatoriamente a los siguientes tratamientos:

- (1) Organismos anestesiados seccionados entre el primer y el segundo segmento abdominal, lo que permitió separar por completo el cefalotórax del abdomen (n= 12)
- (2) Organismos anestesiados que se congelaron enteros (n= 12)
- (3) Organismos sin anestesia seccionado de la misma forma que los organismos del grupo 1 de esta sección (6.1.1.6) (n= 12)
- (4) Organismos sin anestesia y que se congelaron enteros(n= 12)

En el caso de los camarones anestesiados se utilizaron  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de eugenol disuelto en metanol (80:20). Esta mezcla se homogenizó en 5 L de agua antes de agregarse al tanque, con el fin de facilitar su homogenización en el tanque, ya que se observó que si se agregaba directamente la solución de eugenol-etanol al tanque ésta no se homogenizaba y el anestésico no hacía efecto. Después de agregar el anestésico se dejaron transcurrir 15 min antes de iniciar el muestreo de los camarones.

Para realizar el muestreo se extrajo cada camarón de la jaula con especial cuidado para evitar la respuesta de escape. Posteriormente, se le extrajo hemolinfa (aproximadamente  $300 \mu\text{L}$ ) a partir de los senos ventrales en la base del primer segmento abdominal mediante una jeringa de 3 mL enjuagada previamente con una solución isotónica fría con oxalato de sodio al 5% como anticoagulante (Mercier et al., 2006). Dependiendo del grupo al que se asignó el camarón, se realizó la sección después del primer segmento abdominal que permitió separar el cefalotórax del abdomen. Finalmente, se congelaron los organismos (completos en el caso de los camarones del grupo no seccionado o el cefalotórax y abdomen de los seccionados) en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-76^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

#### **6.1.1.7 Efecto de la obtención de hemolinfa**

De un lote de organismos mantenidos en las mismas condiciones que las descritas en la sección anterior (6.1.1.6.), se seleccionaron organismos en intermuda ( $25.7 \pm 0.47$  g)

que se colocaron en unidades tipo jaula (de malla de polietileno extruido, 0.26 m de diámetro y 0.19 m de altura) las cuales se encontraban a su vez dentro de tanques con un volumen de 35 L. Los organismos se dejaron sin disturbios y en ayuno hasta el día siguiente. Los organismos muestreados se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos:

(1) Organismos a los que se les extrajo hemolinfa antes de la congelación (n=12)

Para realizar el muestreo se extrajo el camarón de la jaula en la que se dejaron el día anterior y se obtuvieron las muestras tal como se describió en el bioensayo anterior (sección 6.1.1.6)

(2) Organismos a los que no se les extrajo hemolinfa antes de congelar (n=12)

Inmediatamente después de que se extrajeron de la jaula en la que se dejaron un día antes, se congelaron los organismos por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-76^{\circ}\text{C}$ .

## **6.1.2 Evaluación del estado energético y del estrés oxidativo en la respuesta de escape**

### **6.1.2.1 Bioensayo para la respuesta bioquímica (carga energética adenilica, arginin fosfato, reservas y combustibles, e indicadores de estrés oxidativo)**

#### **6.1.2.1.1. Organismos y condiciones de laboratorio**

Organismos juveniles de *L. vannamei* ( $24.6 \pm 0.4$  g) se obtuvieron del estanque de mareas del CIBNOR y se transfirieron al laboratorio donde se mantuvieron 3 semanas en aclimatación, en las condiciones ya descritas en la sección 6.1.1.6 (experimento de anestesia).

#### **6.1.2.1.2 Organismos utilizados para la medición de nucleótidos y arginin fosfato**

Un día antes del muestreo se observaron al microscopio los urópodos externos de cada organismo para determinar el estadio de muda en el que se encontraba con base en las características propuestas por Promwikorn et al. (2004): aquéllos camarones que se encontraban en el estadio de intermuda (estadio C) o premuda temprana (estadio D0) se colocaron en un tanque de 2.3 m de largo y 1.4 m de ancho (en un volumen de 805 L) con aireación y temperatura controlada a  $28^{\circ}\text{C}$ . Los organismos que conformaron el grupo control se introdujeron de forma individual dentro de unidades tipo jaulas (de malla de polietileno extruido, 0.26 m de diámetro y 0.19 m de altura) mientras que los

organismos de los grupos experimentales 1 y 2 (persecución y recuperación, respectivamente) se dejaron libremente en el tanque. Ensayos preliminares mostraron que si los organismos del grupo control se dejaban libremente en el tanque donde se muestrearían al día siguiente, la captura de los camarones implicaba un número variable de “coletazos” (flexiones del abdomen) típicos de la respuesta de escape por los cuales disminuía la CEA y la concentración de ArgP. Esta observación implica que el posible confinamiento en canastas no afecta de manera negativa estas variables; por el contrario permite obtener niveles basales óptimos de organismos sin perturbación. Todos los organismos fueron transferidos durante la tarde (aproximadamente a las 17:00 horas antes de la segunda alimentación) y se mantuvieron en reposo y sin disturbios hasta el día siguiente al muestrearse, aproximadamente a las 9:00 h, por lo que tuvieron al menos 16 horas de ayuno.

(1) Grupo control: Los organismos se sacaron de forma manual de las unidades tipo jaulas y se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a  $-76^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis ( $n=25$ ). Se tuvo especial cuidado al extraer los organismos de las jaulas para evitar una respuesta de escape espontánea, o flexiones del abdomen.

(2) Grupo experimental 1 (persecución): La persecución consistió en estimular a los organismos ( $n=13$ ) con dos tubos de PVC (0.5 pulgadas) para inducir la respuesta característica de escape a lo largo de la unidad experimental. El camarón se estimuló por dos personas, cada una en un extremo del tanque, con un tubo cada una para que el camarón siempre estuviera recibiendo estímulo y evitar al máximo un periodo de reposo o recuperación durante la respuesta de escape. La estimulación se repitió hasta que el organismo dejó de presentar la respuesta de escape típica aunque los organismos siguieron nadando mediante el continuo movimiento de los pleópodos. En el momento en el que se tocó al organismo tres veces con el tubo de PVC y este ya no respondió con las flexiones abdominales características de la respuesta de escape, se capturó por medio de una red y se congeló por inmersión en nitrógeno líquido, posteriormente; los organismos se almacenaron individualmente en bolsas de polietileno a  $-76^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

El proceso de persecución se filmó con una cámara de video (Sony Handycam DCR-SR45, Japón) tratando de no perder de vista al organismo en ningún momento. Los

videos obtenidos se analizaron para realizar la caracterizar el comportamiento de la respuesta de escape, mediante la cuantificación del número de flexiones abdominales y el tiempo en el que se realizaron

(3) Grupo experimental 2 (persecución y recuperación): Los organismos (n=21) se persiguieron de la misma forma descrita para el grupo experimental 1 pero, después de que no respondieron al estímulo con la respuesta de escape, se introdujeron a una unidad tipo jaula del mismo tipo en donde estuvieron los organismos del grupo control y se dejaron ahí por una hora. Al término de este periodo se capturaron manualmente y se sacrificaron por congelación en nitrógeno líquido. Todos los organismos se almacenaron a  $-76^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### **6.1.2.1.3. Organismos utilizados para el análisis de la composición bioquímica e indicadores de estrés oxidativo**

El procedimiento fue el mismo utilizado con los organismos que se utilizaron para la medición de nucleótidos y fosfágenos (sección 6.1.2.1.2) con la única diferencia que antes de sacrificar a los organismos por inmersión en nitrógeno líquido, se les extrajo hemolinfa (aproximadamente 300  $\mu\text{L}$ ) a partir de los senos ventrales en la base del primer segmento abdominal mediante una jeringa de 3 mL enjuagada previamente con una solución isotónica fría anticoagulante de oxalato de sodio al 5% (Mercier et al., 2006). Si bien se definieron los mismos grupos experimentales, el tamaño de muestras fue distinto, tal como se indica a continuación.

(1) Grupo control (n=10).

(2) Grupo experimental 1 (persecución) (n=11).

(3) Grupo experimental 2 (persecución y recuperación) (n=11).

#### **6.1.2.2. Bioensayo para evaluar el consumo de $\text{O}_2$ posterior a la respuesta de escape**

##### **6.1.2.2.1. Organismos y condiciones de laboratorio**

Juveniles de *L. vannamei* (n=60) obtenidos de estanques del CIBNOR se transfirieron al interior de un laboratorio, se aclimataron por 3 meses y se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas en la sección 6.1.2.1.1.

El día anterior al experimento, a las 17:00 horas se seleccionaron camarones en intermuda, se registró su peso ( $24.6 \pm 0.4$  g), y se colocaron individualmente en un respirómetro o en un tanque, en función del grupo al que aleatoriamente fueran asignados, donde se mantuvieron en reposo hasta el día siguiente. Los valores de los

parámetros del agua en los tanques y en los respirómetros fueron similares bajo los que se mantuvieron los camarones, ya descritas en la sección 6.1.2.1.1. Se tuvo especial cuidado en el manejo de los organismos para evitar flexiones del abdomen por manipulación.

(1) Control sin transferencia o control absoluto: El día anterior los organismos (n=11) se colocaron en el respirómetro, en el cual se cuantificó el consumo de  $O_2$ , a partir de las 9:00 horas en cuanto se iniciaron las determinaciones de OD.

(2) Control con transferencia (n=12): El día anterior al experimento los organismos fueron colocados dentro de una jaula (de malla de polietileno extruido, 0.26 m de diámetro y 0.19 m de altura), en un tanque con capacidad de 35 L y a las 09:00 horas del día en el que se realizó la medición del OD los organismos se extrajeron de forma manual de la jaula y rápidamente se transfirieron al respirómetro.

(3) Persecución sin transferencia (n=15): Los organismos se colocaron en el respirómetro el día anterior, y el día del experimento a las 09:00 horas se estimularon para que respondieran con la respuesta de escape dentro del mismo respirómetro. Para ello se introdujo una red al respirómetro y se capturó al organismo sin sacarlo del agua; una vez dentro de la red, el organismo realizó una serie de flexiones abdominales hasta que dejó de responder, momento en el que se retiró la red y se dejó al organismo en el respirómetro.

(4) Persecución con transferencia del tanque al respirómetro (n=12): La respuesta de escape se estimuló de la misma manera como se describe en la sección 6.1.2.1.2 para el grupo experimental 1, con la única diferencia que esta vez los organismos se colocaron dentro de una jaula como las antes mencionadas y se colocaron en un tanque con 805 L de agua con los mismos parámetros bajo los que se mantuvieron los organismos. Lo anterior debido a que se desconocía si el hecho de que los organismos estuvieran confinados en una jaula o estuvieran libres en el tanque (y por tanto realizaran mayor actividad física al poder desplazarse a lo largo del mismo) tenía un efecto en la duración de la respuesta de escape y el número de flexiones del abdomen. En un lapso no mayor de 10 s después de que el organismo quedó exhausto, se le introdujo en el respirómetro para iniciar las determinaciones del consumo de  $O_2$ . En este último grupo la respuesta de escape se filmó con una videocámara (Sony Handycam DCR-SR45, Japón) lo que

permitió cuantificar el número de flexiones del abdomen así como el tiempo que duró dicha respuesta.

#### **6.1.2.2.2. Medición del consumo de O<sub>2</sub>**

La evaluación del consumo de O<sub>2</sub> se realizó al interior de una cámara con temperatura controlada (gracias a un sistema de refrigeración). Los respirómetros consistieron en peceras (40 x 25 x 30 cm) que contenían 20 L de agua de mar, cubiertas en su exterior con polietileno negro, quedando expuesto a la luz sólo un espacio de 0.020 m para introducir el electrodo del oxímetro polarográfico (modelo 52CE, YSI). La temperatura en los respirómetros se mantuvo en  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidad de 39 ups, y al inicio las peceras estaban al 100% de saturación de O<sub>2</sub>. A las 9:00 horas se detuvo la aireación en todos los respirómetros; posteriormente, se colocaron los camarones de los grupos de transferencia en los respirómetros y se comenzó a registrar la concentración de OD, cada 15 min por seis horas. En todos los casos los organismos contaron con 16 horas de ayuno.

### **6.2 Métodos analíticos**

#### **6.2.1 Cuantificación de nucleótidos y fosfágenos**

##### **6.2.1.1 Obtención y procesamiento de muestras. Extracción de nucleótidos**

Se siguió la metodología descrita por Le Coz (1989) y Moal et al. (1989), con algunas modificaciones que se estandarizaron y, en algunos casos, se validaron (ver Anexo I).

Se pesaron aproximadamente 150 mg de tejido congelado (e.g. para el caso del músculo, se tomó el primer segmento abdominal) y se homogenizaron en 1.5 mL de TCA 0.5 M a  $4^\circ\text{C}$  usando diferentes métodos de homogenización para la estandarización del procesamiento del músculo (ver sección 6.1.1.4). Para varias estandarizaciones metodológicas (6.1.1.1 y 6.1.1.2.) se usó el homogenizador mecánico de flecha (modelo Tempest IQ2), mientras que para la prueba con diferentes condiciones de aclimatación en el laboratorio para el establecer las condiciones óptimas (6.1.1.5.) se usó el homogenizador criogénico (MM400, Retsch, Haan, Alemania) con los procedimientos descritos en la sección 6.1.1.4. El homogenizado obtenido se centrifugó a 3,000 g a  $4^\circ\text{C}$  por 10 min, después de lo cual se recuperaron 0.5 mL del sobrenadante. A éste se adicionó 1.3 mL de una mezcla 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  $4^\circ\text{C}$ , 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 de nuevo. El sobrenadante resultante se separó en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  que fueron almacenadas a  $-76^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Cabe señalar que la neutralización del extracto ácido con diclorometano se llevó a cabo para sustituir la mezcla freón-amina originalmente utilizada (Moal et al., 1989), con base en una estandarización previa realizada con tejido de ostión en la cual no se observó diferencia al utilizar estos dos solventes (Moal, comunicación personal).

#### **6.2.1.2 Condiciones de cromatografía líquida de alta presión para la cuantificación de nucleótidos (ATP, ADP, AMP e IMP)**

La cuantificación se realizó por un sistema 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 que se describen a continuación. Se utilizó una columna Hyperclone ODS (C18) 3  $\mu\text{m}$  (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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3 mM de tetrabutilamonio como el agente de par iónico, 8% de metanol, cuyo pH se ajustó a 6 con NaOH 5 N. Para estandarizar los tiempos de cada corrida, se evaluaron dos concentraciones de metanol como modificador orgánico (5 y 8%) (los resultados se muestran en el Anexo I), con lo cual se optó por usar la concentración de 8% de metanol. El cromatógrafo se operó a un flujo de  $0.8 \text{ mL min}^{-1}$ , 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, todas las soluciones se filtraron 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  $\mu\text{g}$  en 25  $\mu\text{L}$  inyectados, lo cual corresponde a los siguientes rangos en nmoles

0.03-7.19 para el ATP, 0.03 - 8.69 para el ADP, 0.03 - 9.20 para el AMP, 0.03 - 6.79 para GTP, y 0.03 - 7.66 en el caso del GDP. Para realizar la curva estándar de cada nucleótido se pesaron 5 mg y se disolvieron en 10 mL H<sub>2</sub>O desionizada. Se tomaron 100 µL de la solución de cada nucleótido, teniendo, por lo tanto, un volumen final de 500 µL, esta solución se diluyó con H<sub>2</sub>O desionizada y a partir de dichas diluciones se construyó la curva estándar.

Una vez comprobada la linealidad (ver Anexo II), 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<sup>-1</sup> (ver tabla V) 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<sup>-1</sup>. Posteriormente, se realizó una mezcla de nucleótidos a partir de estas soluciones diluidas de acuerdo a la Tabla V. 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. Ocasionalmente, y para algunos de los bioensayos, se utilizaron también estándares de IMP e hipoxantina con concentraciones de 0.21 y 2.47 nmoles, respectivamente, en 25 µL inyectados.

**Tabla V.** Cantidad inyectada (nmoles en 25 µL) de los diferentes nucleótidos.

Nucleótido	Peso molecular <sup>1</sup>	Sol. madre (mg 10 mL <sup>-1</sup> )	Vol. usado de dil 1:100 para la mezcla(µL)	nmoles en 25 µL inyectados
ATP	590.09	5.20	200	0.055
ADP	487.89	5.20	200	0.065
AMP	460.94	5.80	200	0.078
GTP	624.13	5.30	100	0.030
GDP	553.31	5.10	100	0.035

<sup>1</sup> Peso molecular ajustado al contenido de agua y sales para cada lote.

### 6.2.1.3 Condiciones de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la cuantificación de arginin fosfato

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 NH<sub>2</sub> (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 NH<sub>2</sub> (40 mm de largo y 3 mm de ancho, Phenomenex, Torrance, CA), utilizando una fase móvil a base de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM (ajustada a pH 2.6 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y acetonitrilo en una proporción 72:28. El tiempo de corrida fue de 20 min a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. 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 fue 0.06 y 3.80 µg inyectados en 25 µL (lo que equivale a 0.20 y 12.5 nmoles en 25 µL) (Anexo III). Para preparar la curva de calibración 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<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 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<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 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).

### **6.2.2 Reservas, combustibles y metabolitos**

Se utilizaron las muestras obtenidas a partir de los organismos del bioensayo de persecución (sección 6.1.2.1.3). Posterior a su obtención, la hemolinfa fue centrifugada a 1300 g por 10 min a 4°C, y se recuperó el plasma, el cual se utilizó para la cuantificación de hemocianina ese mismo día o bien se almacenó a -76°C para la posterior cuantificación de proteínas totales, lactato, triglicéridos y glucosa.

En el caso de los tejidos se obtuvo una porción (100 mg) de músculo del primer segmento abdominal y de hepatopáncreas, aun estando congelados los tejidos, y se liofilizaron; posteriormente, se hidrataron con 1 mL de solución isotónica (450 mM NaCl y 10 mM KCl). En músculo, se cuantificaron las proteínas totales, glucógeno, y lactato, mientras que en hepatopáncreas, además de lo anterior, se cuantificaron los triglicéridos.

### **Hemocianina**

El plasma se diluyó 1:20 con solución salina isotónica el día en el que se obtuvo, es decir sin previa congelación, y se leyó a 335 nm en un espectrofotómetro (Helios

Omega, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin). La concentración de hemocianina se calculó utilizando el coeficiente de extinción ( $E^{mM}$ ) de 17.26 (Chen y Cheng, 1995).

### **Proteínas totales**

Se utilizó la técnica de Bradford (1976) para cuantificar la concentración de proteínas totales, utilizando albúmina sérica bovina (Sigma, Steinheim, Alemania) como referencia. El plasma, se diluyó 1:100 con solución isotónica salina (KCl 450 mM, NaCl 10 mM), posteriormente en una microplaca se hizo reaccionar con solución de Bradford (Biorad, Hercules, California) y por último se leyó en un lector de microplaca a 595 nm (Multiskan spectrum, Thermo Fisher Scientific).

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.

### **Glucosa, lactato y triglicéridos**

Las determinaciones de glucosa, lactato y triglicéridos se realizaron con base en la metodología descrita por Racotta y Palacios (1998), con adecuación a microplaca utilizando 20  $\mu$ L de muestra.

Para cuantificar la concentración de glucosa, se utilizó un kit comercial basado en el método GOD-PAP, (Randox laboratories limited, County Antrim, Reino Unido). El plasma se diluyó 1:20 con solución salina, se realizó la detección con un lector de microplaca a 490 nm, se cuantificó tomando como referencia una curva estándar (1.56-100.0 mg dL<sup>-1</sup>) con el sustrato, 20  $\mu$ L de muestra y 200  $\mu$ L de la solución reactiva del kit.

Para realizar la cuantificación de la concentración del lactato, el plasma se diluyó 1:20 (método enzimático-PAP Randox laboratories limited); en el caso de los tejidos, 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<sup>-1</sup>) con el sustrato. Se utilizaron 20  $\mu$ L de muestra y 200  $\mu$ L de la solución reactiva del kit

La cuantificación de los triglicéridos 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  $\mu\text{L}$  de plasma u homogenado de tejido y 200  $\mu\text{L}$  de la solución reactiva del kit, se tomó como referencia una curva estándar (3.13-200  $\text{mg dL}^{-1}$ ) del sustrato.

### **Lípidos totales**

Con base en la metodología descrita por Barnes y Balckstock (1973) a una alícuota de plasma u homogenado de tejido (20  $\mu\text{L}$ ) se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  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  $\text{mg mL}^{-1}$ ) (Lin-Trol Sigma L2648).

### **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 frío y se centrifugó (3, 600 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  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72% se incubaron las muestras a 90°C por 10 min y se leyó la absorbancia a 620 nm en un lector de microplaca (curva 3.91-250  $\text{mg dL}^{-1}$ ).

### **6.2.3 Indicadores de estrés oxidativo**

Las metodologías que se describen a continuación fueron implementadas previamente en el laboratorio de Estrés Oxidativo (antes Biomedicina y Salud Ambiental) del CIBNOR. A partir de una porción del músculo del segundo segmento abdominal de los organismos del bioensayo descrito en la sección 6.1.2.1.3 se realizaron las determinaciones que a continuación se describen, mientras que a partir de una porción del hepatopáncreas se determinó sólo la actividad de catalasa y los niveles de peroxidación lipídica.

#### **6.2.3.1 Actividad de enzimas antioxidantes**

Una muestra de músculo (~100 mg) del segundo segmento abdominal o una porción del hepatopáncreas se disectó aun congelada, se disgregó y se homogenizó (Polytron PT 1300D Kinematica AG, Lucerne, Suiza) en una solución (relación 1:20 peso tejido/volumen de solución) compuesta de solución amortiguadora (pH 7) fosfato de

potasio (0.1 M) fluoruro de fenilmetanosulfonilo (1mM) y EDTA (60 mM). Posteriormente fue centrifugada a 3,000 g por 10 min a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se utilizó para el análisis de la actividad de las de enzimas antioxidantes, los niveles de peroxidación lipídica y de carbonilos proteicos.

#### **6.2.3.1.1 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 ( $O_2^{\cdot-}$ ), 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<sup>-1</sup> 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  $O_2^{\cdot-}$  con NBT.

#### **6.2.3.1.2 Glutación peroxidasa selenio dependiente**

La actividad de la glutatión peroxidasa selenio dependiente (GPx) 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 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<sup>-1</sup>), y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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<sup>-1</sup>.

#### **6.2.3.1.3 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 homogenizado, se agregó la solución de reactiva que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en un rango de

0.45 y 0.5 mmoles L<sup>-1</sup>) en solución amortiguadora de fosfatos (0.1 mM), el ensayo se realizó a 25°C y se cuantificó el decremento de la absorbancia a 240 nm ( $\Delta A_{240}$ ) debido al consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>.

### 6.2.3.2 Producción endógena de radical superóxido

La cuantificación de la tasa endógena de producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se realizó con base en lo descrito por Drossos et al. (1995). Rebanadas delgadas de tejido congelado (~ 100 mg) se colocaron en un tubo de ensayo que contenía 1 mL de solución amortiguadora de Krebs bicarbonato (0.12 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, y 11 mM glucosa) se agregó 1 mL de citocromo c, se agitó y se incubó por 15 min a 37°C. Posteriormente, se detuvo la reacción agregando N-etilmaleimida (3 mM), se centrifugó la reacción a 3500 g a 4°C por 10 min; se recuperó el sobrenadante y se leyó a 550 nm en un espectrofotómetro (DU 800, Beckman coulter; Fullerton, California). Se utilizó un blanco para cada muestra que consistió en agregar la misma solución amortiguadora utilizada para la muestra problema y el citocromo c se agregó al final. La tasa endógena de producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se calculó dividiendo la absorbancia de la muestra problema entre el coeficiente de extinción ( $E^{nM} = 21$ ) para el cambio entre ferricitocromo c y ferrocitocromo c. Los datos se expresaron como O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de tejido en base húmeda.

### 6.2.3.3 Peroxidación lipídica

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se cuantificaron con base en lo descrito por Persky et al. (2000). Se utilizó el sobrenadante que resultó de la homogenización del tejido tal y como se describió en la sección 6.2.4.1. La muestra se incubó 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 las muestras en un baño de agua fría y se centrifugaron a 3,000 g por 10 min at 4°C. El sobrenadante se colectó y se leyó a 530 nm a 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<sup>-1</sup>) de malondialdehído bis-dietilacetal en etanol. Los datos se expresaron como nmol de TBARS mg<sup>-1</sup> de proteína.

#### **6.2.3.4 Carbonilos proteicos**

La cuantificación de los niveles de carbonilos proteicos se realizó a partir del complejo formado entre los carbonilos de las proteínas y 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH por sus siglas en inglés), basado en la metodología de Levine et al. (2000). Las muestras de tejido (100 mg) se homogenizaron en ácido sulfosalicílico y se centrifugaron a 15,000 g por 10 min a 4°C; el sobrenadante se incubó en una mezcla de DNPH 10 mM y HCl 2 M a temperatura ambiente por una hora (las muestras se agitaron cada 15 min). En el caso de los blancos de cada muestra, solo se les agregó HCl 2 M. A continuación se agregó TCA al 20% y se procedió a centrifugar por 10 min a 13,000 g. Se lavaron los precipitados tres veces, con etanol y etil acetato (1:1), se re-suspendieron en clorato de guanidina 6 M y se incubaron a 37°C por 15 min en agitación continua. Tanto las muestras como los blancos se centrifugaron inmediatamente por 5 min a 13,000 g. El sobrenadante resultante se leyó en el espectrofotómetro en el rango de 360-410 nm (espectrofotómetro DU 800, Beckman Coulter, Fullerton, California) y se registró la máxima absorbancia. Los datos se expresan como nmol carbonilos proteicos mg<sup>-1</sup> de tejido en peso húmedo.

#### **6.2.3.5 Proteínas totales**

La concentración de las proteínas totales se realizó con base en la metodología de (Bradford, 1976), tal como ya se describió en la sección 6.2.2. La concentración de proteínas totales se expresaron como mg de proteína g<sup>-1</sup> tejido.

### **6.3. Análisis estadístico**

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el paquete Statistica versión 8.0. 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, cuadrado, inverso). Los datos se compararon por análisis de varianza de una vía para la mayoría de los experimentos excepto para los experimentos de uso de anestesia y consumo de oxígeno durante la recuperación de la respuesta de escape, en los cuales se aplicó un análisis de varianza de dos vías (anestesia x sección o tratamiento x tiempo, respectivamente). La comparación de medias se realizó por la prueba Newman-Keuls. En los experimentos donde se aplicó un análisis de varianza de dos vías, la comparación de medias se hizo para las medias

globales dentro de cada factor (e.g. diferentes tiempos para el consumo de O<sub>2</sub>) o bien para las medias individuales únicamente cuando la interacción entre ambos factores fue significativa. Las diferencias se reportaron como significativas cuando  $p \leq 0.05$ . Los datos se reportaron como media  $\pm$  error estándar.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Estandarización de la obtención y del procesamiento de muestras para la cuantificación de la carga energética adenilica y los niveles de arginin fosfato en camarón

#### 7.1.1 Comparación de la congelación con nitrógeno líquido y la disección rápida a temperatura ambiente

No se observaron diferencias significativas en la concentración de los nucleótidos adenilicos totales (NAT) y la CEA por el procedimiento del muestreo, aunque se observó una menor concentración de ATP y nucleótidos adenilicos totales ( $p > 0.05$ ) en las muestras disectadas de los camarones no congelados (Tabla VI).

**Tabla VI.** Efecto de la congelación en nitrógeno líquido en la concentración de los nucleótidos de adenina y en la carga energética adenilica de músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

	<b>Disección directa (n = 4)</b>	<b>Congelamiento en nitrógeno líquido (n = 4)</b>
ATP	7.09 ± 0.51	7.93 ± 0.31
ADP	0.97 ± 0.38	0.94 ± 0.15
AMP	0.10 ± 0.08	0.05 ± 0.01
NAT	8.16 ± 0.87	8.92 ± 0.34
CEA	0.94 ± 0.02	0.94 ± 0.01

La concentración de los nucleótidos se expresa en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportan como medias  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ . ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato, NAT: nucleótidos adenilicos totales, CEA: carga energética adenilica.

#### 7.1.2. Efecto de los diferentes métodos de enfriamiento de los organismos para su muestreo

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de varios nucleótidos adenilicos y los valores de la CEA entre los camarones que fueron congelados en nitrógeno líquido de forma individual en comparación con el resto de los tres grupos (Tabla VII). En particular, la disminución de la CEA que se observó en el grupo 2 (organismos que se muestrearon de forma masiva y que se congelaron después de un periodo corto de exposición aérea y de confinamiento de los organismos en la red) y en el grupo 3 (organismos que fueron sumergidos en agua a 7°C), se acompañó de una disminución de ATP y un incremento de ADP y AMP. El grupo de organismos



enfriados en cama de hielo (grupo 4) presentó los valores de CEA más bajos debido a un decremento de ATP e incremento de AMP aún más pronunciado. La concentración de NAT fue significativamente menor en los organismos no congelados en nitrógeno líquido (grupos 3 y 4). La concentración de ArgP siguió un patrón similar al del ATP y la CEA, con una disminución en los grupos 2, 3 y 4, aunque en este caso no se observó una disminución más acentuada en el grupo 4 con respecto a los grupos 2 y 3. Por otro lado, el patrón observado en el IMP fue diferente al de la CEA o al del ATP dado que la concentración de IMP en los organismos que no fueron muestreados con nitrógeno líquido fue similar entre ellos y fue por lo menos 9 veces mayor a la concentración detectada en los dos primeros grupos.

**Tabla VII.** Concentración en músculo de los nucleótidos de adenina, carga energética adenilica y arginin fosfato en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* expuesto a diferentes condiciones de enfriamiento antes del muestreo.

	<b>Grupo 1</b> (inmersión inmediata en nitrógeno líquido, n= 11)	<b>Grupo 2</b> (inmersión en nitrógeno líquido retardada, n= 10)	<b>Grupo 3</b> (agua a 7°C, n = 8)	<b>Grupo 4</b> (cama de hielo, n = 9)
ATP	6.81 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.57 ± 0.70 <sup>a</sup>	3.43 ± 0.54 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.51 <sup>a</sup>
ADP	1.46 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.09 ± 0.23 <sup>b</sup>	2.33 ± 0.20 <sup>b</sup>
AMP	0.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.45 <sup>bc</sup>	0.95 ± 0.36 <sup>b</sup>	2.50 ± 0.46 <sup>c</sup>
NAT	8.52 ± 0.34 <sup>b</sup>	8.15 ± 0.35 <sup>b</sup>	6.46 ± 0.48 <sup>a</sup>	6.66 ± 0.38 <sup>a</sup>
CEA	0.88 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.61 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>a</sup>
IMP	0.04 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.15 <sup>b</sup>
ArgP	13.7 ± 3.44 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.49 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.74 <sup>a</sup>	2.79 ± 1.09 <sup>a</sup>

La concentración de los nucleótidos se expresa en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportan como medias  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ . ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato, NAT: nucleótidos adenilicos totales, CEA: carga energética adenilica, IMP: inosin monofosfato, ArgP: arginin fosfato.

### 7.1.3 Efecto del almacenamiento prolongado a -76°C en la concentración de los diferentes nucleótidos y de la carga energética adenilica

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de los nucleótidos individuales o totales ni en la CEA en músculo de organismos almacenados hasta por 23 meses ( $p > 0.05$ ), los valores de la CEA fluctuaron entre 0.85 y 0.90 (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Efecto del almacenamiento prolongado a  $-76^{\circ}\text{C}$  en la concentración de los diferentes nucleótidos y de la carga energética adenilica en músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

	Tiempo de almacenamiento				
	1 semana (n= 5)	3 semanas (n= 5)	3 meses (n= 5)	6 meses (n= 5)	23 meses (n= 5)
ATP	6.41 ± 0.51	7.14 ± 0.51	6.32 ± 0.55	7.45 ± 0.22	5.94 ± 0.72
ADP	1.24 ± 0.16	1.65 ± 0.19	1.60 ± 0.27	1.48 ± 0.35	1.59 ± 0.44
AMP	0.16 ± 0.05	0.32 ± 0.11	0.31 ± 0.11	0.23 ± 0.13	0.44 ± 0.27
NAT	7.81 ± 0.53	9.10 ± 0.29	8.23 ± 0.62	9.16 ± 0.35	7.97 ± 0.34
CEA	0.90 ± 0.02	0.87 ± 0.03	0.87 ± 0.02	0.90 ± 0.03	0.85 ± 0.06

La concentración de los nucleótidos se expresa en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportan como medias  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ . ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato, NAT: nucleótidos adenilicos totales, CEA: carga energética adenilica.

#### 7.1.4 Diferentes métodos de homogenización para el procesamiento de tejido

Los menores valores de CEA se obtuvieron al utilizar el homogenizador con esferas o perlas en comparación con el molino mezclador criogénico y las muestras procesadas con el homogenizador mecánico tipo flecha ( $p < 0.05$ ). Los valores menores de CEA obtenidos con el homogenizador de esferas se deben principalmente a la disminución de la concentración del ATP ( $p < 0.05$ ) y al incremento del AMP ( $p < 0.05$ ). Adicionalmente se observó una disminución del ADP ( $p < 0.05$ ) que, sin embargo, no afectó la CEA (Tabla IX).

**Tabla IX.** Concentración de los diferentes nucleótidos de adenina y carga energética adenilica en muestras de músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* procesadas con diferentes equipos.

	Homogenizador de esferas (n = 6).	Homogenizador mecánico de flecha (n = 6).	Molino mezclador criogénico (n = 6).
ATP	7.05 ± 1.00 <sup>a</sup> (34.8)	8.20 ± 0.48 <sup>ab</sup> (14.3)	9.78 ± 0.35 <sup>b</sup> (8.7)
ADP	2.56 ± 0.46 <sup>b</sup> (43.5)	2.11 ± 0.30 <sup>b</sup> (35.0)	0.98 ± 0.16 <sup>a</sup> (39.3)
AMP	1.22 ± 0.30 <sup>c</sup> (59.5)	0.39 ± 0.11 <sup>b</sup> (69.7)	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup> (81.7)
NAT	10.8 ± 1.02 (23.2)	10.7 ± 0.44 (10.1)	10.8 ± 0.24 (5.4)
CEA	0.76 ± 0.04 <sup>a</sup> (12.0)	0.87 ± 0.02 <sup>b</sup> (6.7)	0.95 ± 0.01 <sup>c</sup> (2.6)

La concentración de los nucleótidos se expresa en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportan como medias  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ . ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato, NAT: nucleótidos adenilicos totales, CEA: carga energética adenilica.

## 7.1.5 Condiciones óptimas de los organismos para la obtención de muestras

### 7.1.5.1 Condiciones de aclimatación en el laboratorio

Los camarones que se transfirieron de estanques al laboratorio un día antes de ser muestreados, presentaron valores de CEA y ArgP significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores a los detectados en camarones mantenidos en el laboratorio en tanques claros al interior del laboratorio a una alta densidad de organismos (Tabla X). Para el caso de los camarones mantenidos en el interior del laboratorio en un tanque oscuro a una densidad intermedia, se obtuvieron valores intermedios tanto de CEA como de ArgP ( $p < 0.05$  vs tanque claros;  $p > 0.05$  vs recién transferidos de estanques). Las diferencias encontradas en los valores de CEA se deben principalmente a las diferencias en las concentraciones del ATP en los tres grupos. La concentración de los nucleótidos totales en camarones recién transferidos de estanques fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a los otros dos grupos e incluso mayor a los valores obtenidos en los bioensayos realizados con organismos de tanques al exterior (ver tablas VI a VIII).

**Tabla X.** Concentración de los diferentes nucleótidos de adenina, carga energética adenilica y arginin fosfato en músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* bajo diferentes condiciones de mantenimiento.

	<b>Grupo 1</b> <b>(n = 16)</b>	<b>Grupo 2</b> <b>(n = 5)</b>	<b>Grupo 3</b> <b>(n = 22)</b>
ATP	9.43 ± 0.46 <sup>b</sup>	6.00 ± 0.62 <sup>a</sup>	7.19 ± 0.31 <sup>a</sup>
ADP	1.83 ± 0.35	3.03 ± 0.62	2.16 ± 0.21
AMP	0.32 ± 0.12	0.88 ± 0.39	0.42 ± 0.09
NAT	11.58 ± 0.51 <sup>b</sup>	9.91 ± 1.25 <sup>a</sup>	9.77 ± 0.30 <sup>a</sup>
CEA	0.90 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.02 <sup>b</sup>
ArgP	16.74 ± 3.89 <sup>b</sup>	2.77 ± 0.34 <sup>a</sup>	9.08 ± 1.64 <sup>b</sup>

La concentración de los nucleótidos se expresa en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportan como medias  $\pm$  error estándar,  $p < 0.05$ . Grupo 1: recién transferidos de un estanque, grupo 2: 1 mes en tanques al interior de un laboratorio, condiciones sub-óptimas, grupo 3: grupo 2 mantenido en condiciones óptimas por 1 mes ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato CEA: carga energética adenilica, NAT: nucleótidos adenilicos totales, ArgP: arginin fosfato.

### 7.1.5.2 Uso de anestesia durante el muestreo

El número de flexiones del abdomen de los camarones ("coletazos") resultó significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en los organismos anestesiados en comparación con aquellos sin anestesia. Los organismos anestesiados que fueron congelados seccionados

o enteros realizaron  $1.8 \pm 0.5$  y  $0.8 \pm 0.4$  flexiones abdominales, respectivamente ( $p > 0.05$ ), mientras que los organismos sin anestesia que fueron congelados seccionados o enteros realizaron  $4.0 \pm 0.9$  y  $3.3 \pm 1.2$  flexiones, respectivamente ( $p > 0.05$ ). En el caso de los organismos no anestesiados, cuando estos se retiraron de la jaula para su muestreo respondieron (de forma normal) con la respuesta de escape. Por ello, se puso especial cuidado al capturar los organismos, ya que de no capturar al organismo en el primer intento, este realiza una serie de flexiones del abdomen. Sin embargo, frecuentemente presentaron una o dos flexiones del abdomen durante la captura y posteriormente otras flexiones durante la toma de hemolinfa y la inmersión en nitrógeno líquido. Los organismos anestesiados, realizaron coletazos durante la extracción de la hemolinfa y la inmersión en nitrógeno líquido.

#### ***Nucleótidos y arginin fosfato***

Se encontró un efecto significativo del uso de anestesia sobre la CEA, que fue mayor en camarones anestesiados ( $0.94 \pm 0.01$ ) comparados con camarones sin anestesia ( $0.87 \pm 0.02$   $p < 0.05$ ). Por otro lado, los organismos congelados enteros presentaron una CEA significativamente menor ( $0.87 \pm 0.02$ ) que los organismos seccionados entre el primer y segundo segmento abdominal ( $0.94 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo y tal como lo muestra la interacción significativa ( $p < 0.05$ ), los efectos de la anestesia y de la sección se deben en realidad a que los organismos sin anestesia y enteros presentaron los valores más bajos de CEA comparado con los otros tres grupos) (fig. 1A).

Las concentraciones de ADP y AMP en músculo fueron significativamente mayores para los organismos sin anestesia y congelados enteros mientras que la menor concentración se encontró en los organismos anestesiados y seccionados en el primer segmento abdominal. De hecho, de manera similar que para la CEA, el efecto significativo del uso de anestesia y de la sección del primer segmento abdominal se debe en buena medida a los valores altos del grupo no anestesiado y congelados enteros. Las concentraciones de ATP y ArgP fueron significativamente mayores en el grupo de los camarones que se anestesiaron en comparación a los que no se anestesiaron ( $p < 0.05$ ), mientras que los organismos a los que se les realizó la sección en el primer segmento abdominal presentaron mayor ( $p < 0.05$ ) concentración que aquellos organismos congelados enteros. En el caso de los organismos anestesiados, aquellos en los que no se realizó la sección presentaron una concentración de ATP y ArgP 15 y 22%

menor ( $p < 0.05$ ), respectivamente, en comparación con los organismos seccionados. En los organismos sin anestesia la disminución de ATP y ArgP fue de 17 y 62% respectivamente (ver tabla XI y fig. 1B).

La concentración de los NAT fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en organismos anestesiados y enteros, y significativamente mayor en los organismos que se anestesiaron y que se seccionaron. Por lo anterior, no se encontró efecto al analizar por separado la anestesia o la sección en el primer segmento abdominal.

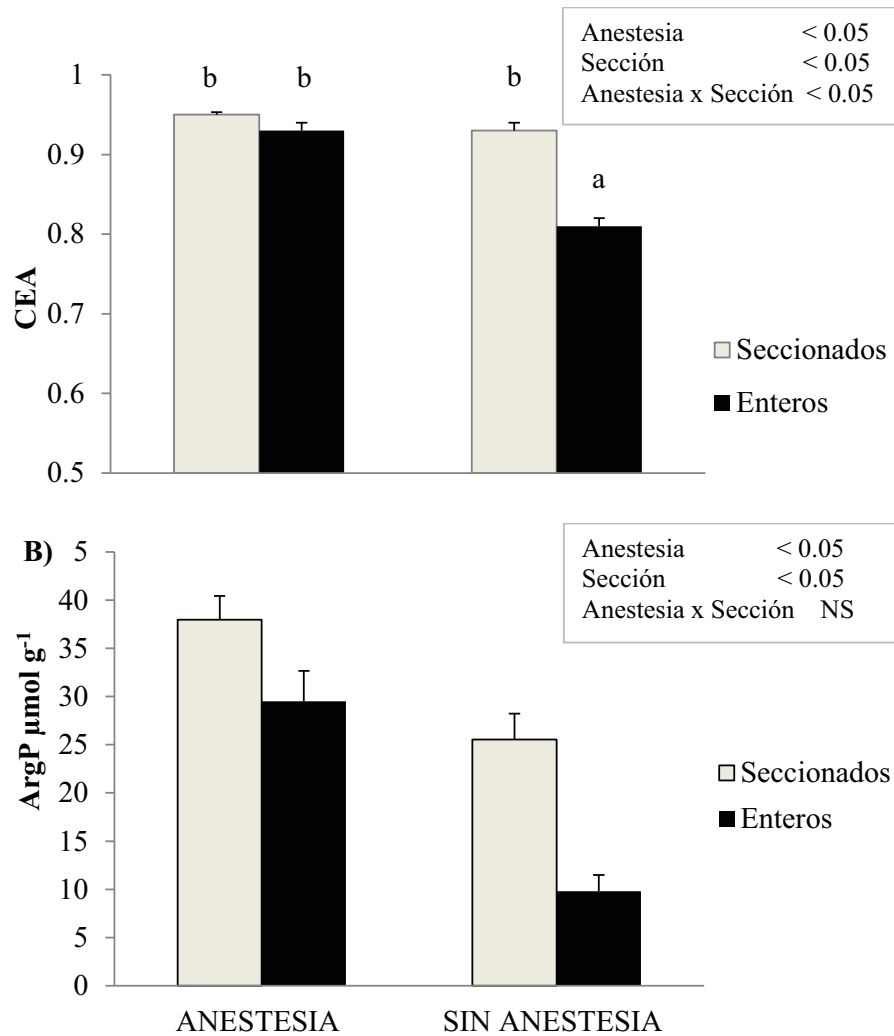
La concentración de IMP fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los organismos sin anestesia en comparación a aquellos que se anestesiaron, la sección en el primer segmento abdominal no afectó significativamente al IMP, ni hubo interacción. No se observaron diferencias significativas por el efecto de la sección o la anestesia para los niveles de hipoxantina (Hx).

No se encontraron diferencias significativas en los nucleótidos analizados en el hepatopáncreas (tabla XI).

**Tabla XI.** Concentración de nucleótidos y carga energética adenínica en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* anestesiado y disectado antes de su congelación.

	ANESTESIA		SIN ANESTESIA		A	S	AxS
	Seccionados <sup>1</sup> (n= 12)	Enteros (n= 12)	Seccionados <sup>1</sup> (n= 12)	Enteros (n= 12)			
<b>Músculo</b>							
ATP	7.40 ± 0.35	6.26 ± 0.42	6.40 ± 0.27	5.28 ± 0.35	*	*	
ADP	0.78 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.18 <sup>b</sup>	*	*	*
AMP	0.02 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.07 <sup>b</sup>	*	*	*
NAT	8.20 ± 0.38 <sup>b</sup>	7.18 ± 0.39 <sup>a</sup>	7.43 ± 0.28 <sup>ab</sup>	7.94 ± 0.32 <sup>ab</sup>			*
IMP	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.003	0.02 ± 0.002	0.04 ± 0.01	*		
Hx	0.01 ± 0.04	0.01 ± 0.003	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.004			
<b>Hepatopáncreas</b>							
ATP	1.07 ± 0.14	0.81 ± 0.08	1.08 ± 0.18	0.88 ± 0.06			
ADP	0.38 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.05			
AMP	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.02			
NAT	1.58 ± 0.15	1.26 ± 0.10	1.61 ± 0.22	1.42 ± 0.12			
CEA	0.78 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.79 ± 0.02	0.77 ± 0.02			
IMP	0.57 ± 0.06	0.53 ± 0.05	0.60 ± 0.11	0.51 ± 0.08			
Hx	0.48 ± 0.08	0.47 ± 0.07	0.33 ± 0.02	0.39 ± 0.05			

La concentración de los nucleótidos se expresa en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportan como medias  $\pm$  error estándar. Se indican los resultados del ANOVA bifactorial ( $p < 0.05$ ) (Donde A = factor anestesia y S = factor sección) en las tres últimas columnas. Únicamente cuando la interacción fue significativa, las medias dentro de la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) de lo contrario el efecto significativo de cada factor en el ANOVA indica *per se* la diferencia entre organismos anestesiados y no anestesiados o entre organismos seccionados o enteros. ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato NAT: Nucleótidos adenílicos totales, CEA: carga energética adenínica, IMP: inosin monofosfato, Hx: Hipoxantina. 1: en el primer segmento abdominal.



**Figura 1.** (A) CEA y (B) ArgP ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* anestesiado entero y con sección en el primer segmento abdominal antes de congelarse para su posterior análisis. Los valores en base húmeda. Los datos se reportan como medias  $\pm$  error estándar ( $n=12$  para cada uno de los cuatro grupos). Se indican los resultados del ANOVA bifactorial,  $p < 0.05$  en el recuadro. Únicamente cuando la interacción fue significativa, se aplicó un análisis de posthoc (Newman-Keuls), diferentes letras dentro de la misma fila representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las medias individuales de lo contrario el efecto significativo de cada factor en el ANOVA indica *per se* la diferencia entre organismos anestesiados y no anestesiados o entre organismos seccionados o enteros. CEA: carga energética adenilica; ArgP: arginin fosfato.

***Variables bioquímicas (reservas, combustibles y metabolitos)***

La concentración de triglicéridos en el plasma fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los organismos seccionados, no se encontró efecto por la anestesia, ni interacción. No se observaron diferencias significativas en el resto de las variables analizadas (Tabla XII).

En el hepatopáncreas se encontró una concentración significativamente ( $p < 0.05$ ) menor de proteínas totales en los organismos seccionados en comparación con los organismos congelados enteros. Aunque la interacción no fue significativa, este efecto se debió al valor más alto del grupo de camarones no anestesiados y que se congelaron enteros.

Para la glucosa, se encontró una concentración significativamente mayor en los organismos anestesiados que en los no anestesiados ( $p < 0.05$ ). En el resto de las variables del hepatopáncreas y en todas las variables del músculo no se observó un efecto por la anestesia o de la sección en el primer segmento abdominal.



**Tabla XII.** Variables metabólicas cuantificadas en plasma, hepatopáncreas y músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* anestesiado y seccionado antes de su congelación.

	ANESTESIA		SIN ANESTESIA		A	C	AxS
	Seccionados <sup>1</sup> (n= 12)	Enteros (n= 12)	Seccionados <sup>1</sup> (n= 12)	Enteros (n= 12)			
<b>Plasma</b>							
Hemocianina	84.2 ± 7.49	84.0 ± 4.04	93.8 ± 3.67	89.8 ± 4.42			
Proteínas totales	188.5 ± 15.9	187.7 ± 18.5	200.2 ± 10.1	183.5 ± 12.6			
Triglicéridos	57.1 ± 4.17	53.2 ± 4.69	60.2 ± 3.24	48.3 ± 3.17			*
Lactato	3.54 ± 0.52	3.32 ± 0.58	3.62 ± 0.41	4.43 ± 0.61			
Glucosa	24.1 ± 3.25	23.9 ± 1.86	24.0 ± 2.07	24.3 ± 2.36			
<b>Hepatopáncreas</b>							
Proteínas totales	136.8 ± 7.10	152.9 ± 33.4	144.2 ± 6.12	263.1 ± 78.7			*
Lípidos totales	261.9 ± 29.6	262.6 ± 30.5	278.6 ± 17.1	184.3 ± 26.7			
Triglicéridos	90.5 ± 9.73	96.7 ± 11.5	89.3 ± 4.50	72.8 ± 8.32			
CHOS totales	75.1 ± 8.61	78.9 ± 11.6	72.1 ± 5.00	80.2 ± 7.31			
Glucógeno	15.8 ± 2.43	17.3 ± 2.64	16.1 ± 1.23	16.6 ± 2.52			
Glucosa	7.19 ± 2.22	9.53 ± 2.72	3.16 ± 1.15	2.94 ± 0.84			*
Lactato	0.42 ± 0.13	0.37 ± 0.11	0.43 ± 0.14	0.61 ± 0.22			
<b>Músculo</b>							
Proteínas totales	865.0 ± 39.8	905.3 ± 44.6	880.6 ± 45.5	942.1 ± 43.02			
CHOS totales	55.4 ± 8.33	53.6 ± 8.13	59.0 ± 5.54	53.1 ± 6.48			
Glucógeno	18.9 ± 3.17	24.5 ± 2.73	19.7 ± 3.69	21.3 ± 2.96			
Lactato	3.35 ± 0.70	3.78 ± 0.61	4.99 ± 0.97	5.21 ± 1.05			

En hepatopáncreas y músculo, las concentraciones se expresan en mg g<sup>-1</sup> de peso seco, en el caso del plasma los resultados se expresan en mg mL<sup>-1</sup> para hemocianina y proteínas totales, y mg dL<sup>-1</sup> para triglicéridos, glucosa y lactato. Los resultados se reportan como medias ± error estándar. Se indican los resultados del ANOVA bifactorial (p<0.05) (Donde A: factor anestesia y S: factor sección) en las tres últimas columnas. Se indica con un asterisco cuando un factor presentó diferencia significativa, (p<0.05). CHOS: carbohidratos; 1: en el primer segmento abdominal.

### 7.1.5.3 Efecto de la extracción de hemolinfa durante el muestreo

Los camarones del grupo en el que se no se extrajo hemolinfa realizaron 5.08 ± 0.97 flexiones del abdomen mientras que los del grupo al que se extrajo hemolinfa los camarones realizaron 5.92 ± 0.90 flexiones (p>0.05).

### *Nucleótidos y arginin fosfato*

Se encontró una concentración de nucleótidos totales 16% mayor en el músculo de los organismos a los que se les extrajo hemolinfa que a los que no se les extrajo hemolinfa

( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de los nucleótidos y la ArgP en músculo por la extracción de hemolinfa (Tabla XIII).

En el hepatopáncreas, la CEA fue significativamente menor en los organismos a los que se les extrajo hemolinfa ( $p < 0.05$ ). El resto de los nucleótidos no se vieron afectados por la extracción de hemolinfa.

#### *Variables metabólicas*

Con excepción de la glucosa en músculo, la cual fue significativamente mayor en los organismos a los que se les extrajo hemolinfa ( $p < 0.05$ ), no se observaron diferencias en la concentración del resto de las variables analizadas (Tabla XIV).

**Tabla XIII.** Concentración de los diferentes nucleótidos de adenina, carga energética adenílica y arginin fosfato en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en los que se tomó muestra de hemolinfa antes de congelarse para su almacenamiento.

	Sin manipulación (n= 12)	Con toma de hemolinfa (n= 12)
<b>Músculo</b>		
ATP	3.78 ± 0.24	4.32 ± 0.33
ADP	3.05 ± 0.25	3.51 ± 0.12
AMP	1.35 ± 0.24	1.46 ± 0.13
NAT	8.18 ± 0.37	9.29 ± 0.24*
CEA	0.66 ± 0.03	0.65 ± 0.02
IMP	0.04 ± 0.004	0.04 ± 0.003
Hx	0.02 ± 0.005	0.01 ± 0.002
ArgP	3.15 ± 0.62	3.29 ± 0.53
<b>Hepatopáncreas</b>		
ATP	0.90 ± 0.06	0.77 ± 0.07
ADP	0.27 ± 0.03	0.32 ± 0.03
AMP	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01
NAT	1.27 ± 0.09	1.20 ± 0.09
CEA	0.82 ± 0.01	0.77 ± 0.01*
IMP	0.50 ± 0.07	0.55 ± 0.07
Hx	0.57 ± 0.07	0.59 ± 0.08

La concentración de los nucleótidos se expresa en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportan como medias  $\pm$  error estándar. \* diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). ATP: adenosin trifosfato, ADP: adenosin difosfato, AMP: adenosin monofosfato NAT: Nucleótidos adenílicos totales, CEA: carga energética adenílica, IMP: inosin monofosfato, Hx: Hipoxantina, ArgP: arginin fosfato.

**Tabla XIV.** Variables metabólicas cuantificadas en hepatopáncreas y músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en los que se tomó muestra de hemolinfa antes de congelarse para su almacenamiento.

	Sin manipulación (n= 12)	Con toma de hemolinfa (n= 12)
<b><i>Hepatopáncreas</i></b>		
Proteínas totales	182.6 ± 11.3	204.9 ± 37.3
Lípidos totales	341.2 ± 25.2	304.0 ± 24.7
Triglicéridos	20.1 ± 2.03	17.3 ± 2.36
CHO totales	82.7 ± 4.76	72.8 ± 3.96
Glucógeno	32.8 ± 1.92	29.6 ± 2.12
Glucosa	6.23 ± 0.50	7.25 ± 1.34
Lactato	0.05± 0.01	0.13 ± 0.03
<b><i>Músculo</i></b>		
Proteínas totales	438.1 ± 32.0	466.8 ± 41.9
CHO totales	40.7 ± 4.12	46.6 ± 4.73
Glucógeno	9.01 ± 0.97	11.6 ± 1.51
Glucosa	2.73 ± 0.14	3.37 ± 0.14*
Lactato	2.29± 0.27	2.72 ± 0.24

La concentración se expresó en mg g<sup>-1</sup> de peso seco. Los resultados se reportan como medias ± error estándar. \*diferencia significativa (p<0.05). CHO: carbohidratos.

## 7.2 Evaluación del estado energético y del estrés oxidativo en la respuesta de escape

### 7.2.1 Respuesta de comportamiento

En general, los organismos respondieron a la estimulación (amenazante e intento por capturarlos) con flexiones abdominales (“coletazos”) vigorosas y consecutivas. El organismo se consideró agotado cuando el camarón dejó de responder con flexiones del abdomen. Sin embargo, a pesar de no presentar este tipo de flexiones del abdomen, el camarón si permanecía nadando por movimiento de los pleópodos, con lo cual no se desplazó una distancia considerable, quedando vulnerable o siendo fácil de capturar. En el caso del primer muestreo (nucleótidos y ArgP), el número de coletazos totales fue de 29 ± 1 en 25 ± 7 s, mientras que en el segundo muestreo (resto de las variables analizadas) los camarones realizaron 26 ± 5 coletazos en 25 ± 6 s.

### 7.2.2 Metabolismo energético durante la respuesta de escape

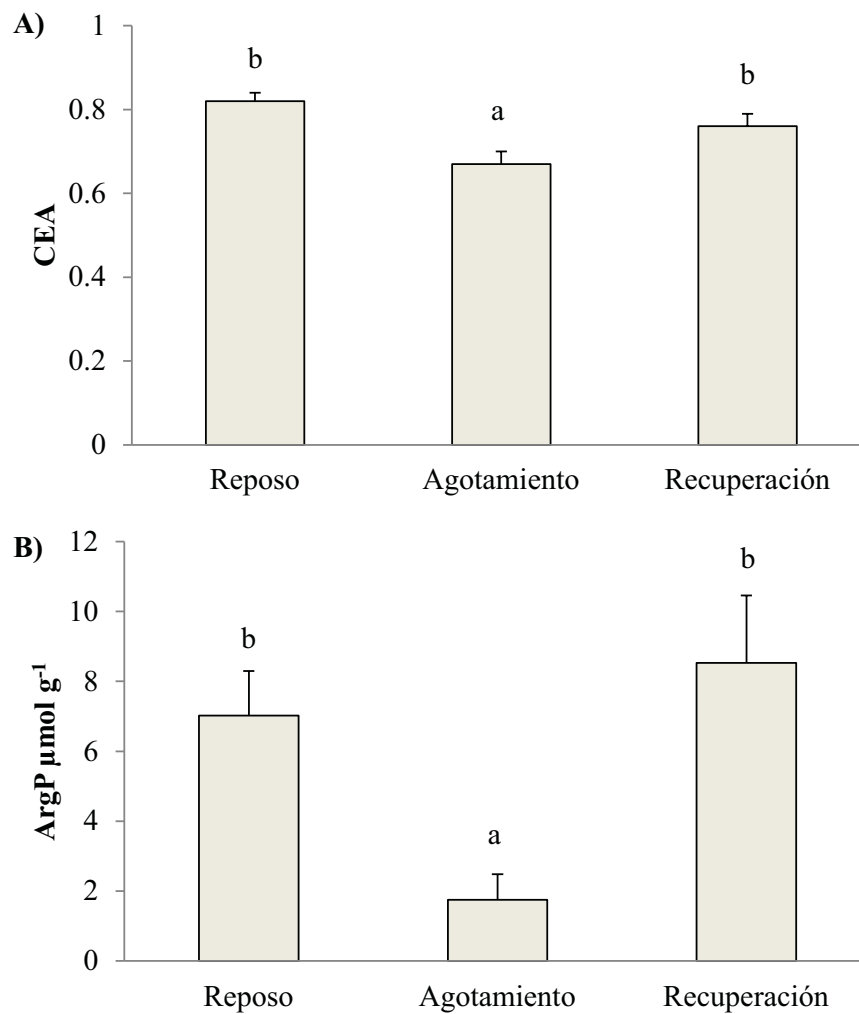
En músculo de los organismos agotados, se observó una menor concentración de ATP y mayor concentración de ADP ( $p < 0.05$ ) y AMP ( $p > 0.05$ ) con respecto al grupo control que se encontraba en reposo (Tabla XV). Después de una hora de recuperación, los valores del ADP y AMP no fueron estadísticamente diferentes a los observados en camarones en reposo-control, mientras que la concentración de ATP no se restableció completamente, y fue ligera pero significativamente ( $p < 0.05$ ) menor que el valor encontrado en los organismos control ( $p < 0.05$ ). La concentración de IMP fue mayor en los camarones agotados en comparación con los organismos en reposo ( $p < 0.05$ ) y se mantuvieron elevados hasta una hora después del periodo de recuperación ( $p < 0.05$ ) (Tabla XV). La concentración de los nucleótidos totales permaneció constante después de la actividad física, así como durante la recuperación. Como resultado de los cambios individuales en las concentraciones de ATP, ADP y AMP, la CEA disminuyó en un 18% en el grupo agotado en comparación al control ( $p < 0.05$ ), y posteriormente se restableció en el periodo de recuperación siendo similar al valor encontrado en los organismos en reposo (Fig. 2A). Un patrón similar se observó en la concentración de ArgP, pero en este caso la disminución del metabolito observada en el grupo de los agotados fue más pronunciada ya que disminuyó 75% con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2B).

En el hepatopáncreas, la concentración de ATP fue 31% y 52% mayor en los organismos después de la recuperación, en comparación al grupo control y al de los agotados ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ), respectivamente. En consecuencia, la CEA incrementó significativamente después del periodo de recuperación en un 16% en comparación con los organismos agotados ( $p < 0.05$ ). La concentración de IMP aumentó también después del periodo de recuperación, siendo 74% mayor que en los organismos del grupo control ( $p < 0.05$ ). Las concentraciones de ATP y NAT fueron 11 y 9 veces mayores, respectivamente, en el músculo con respecto al hepatopáncreas, mientras que la concentración del IMP en el hepatopáncreas fue 20 veces mayor al del músculo (Tabla XV).

**Tabla XV.** Concentración de nucleótidos de adenina y carga energética adenilica en músculo y hepatopáncreas en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en reposo, después de realizar flexiones abdominales hasta un estado de agotamiento por fatiga muscular y después de una hora de recuperación.

	<b>Reposo (n=25)</b>	<b>Agotados (n = 13)</b>	<b>Recuperación (n = 21)</b>
<b><i>Músculo</i></b>			
ATP	6.98 ± 0.33 <sup>c</sup>	4.56 ± 0.28 <sup>a</sup>	5.79 ± 0.41 <sup>b</sup>
ADP	2.36 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.25 <sup>b</sup>	2.44 ± 0.24 <sup>a</sup>
AMP	0.63 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.45 ± 0.19 <sup>bc</sup>	0.99 ± 0.17 <sup>b</sup>
NAT	9.97 ± 0.30	9.35 ± 0.29	9.22 ± 0.30
IMP	0.03 ± 0.003	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>c</sup>
<b><i>Hepatopáncreas</i></b>			
ATP	0.65 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.06 <sup>b</sup>
ADP	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.32 ± 0.03
AMP	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.11 ± 0.02
NAT	1.10 ± 0.05	1.09 ± 0.06	1.28 ± 0.08
CEA	0.73 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.68 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.02 <sup>b</sup>
IMP	0.61 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.71 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.11 <sup>b</sup>

La concentración de los nucleótidos se expresó en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los resultados se reportaron como medias  $\pm$  error estándar. Valores dentro de la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).



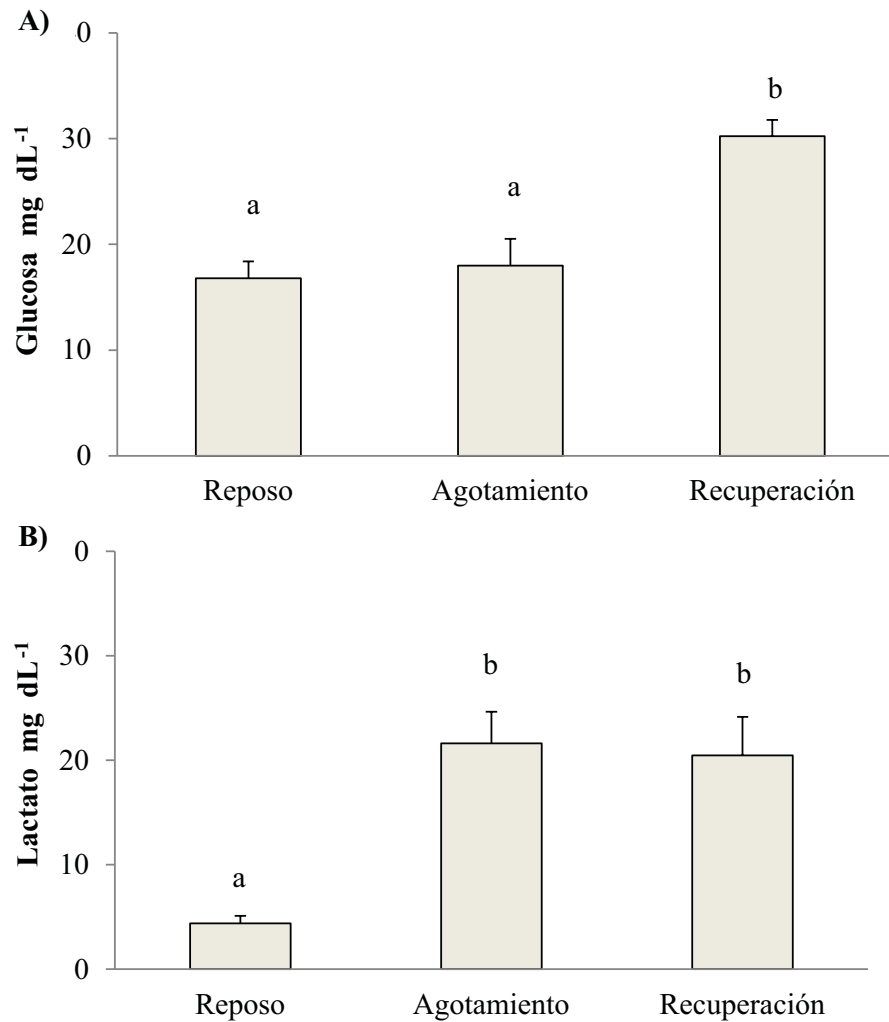
**Figura 2.** (A) CEA y (B) ArgP ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) en músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en reposo, después de flexiones abdominales repetidas hasta un estado de agotamiento por fatiga muscular, y después de una hora de recuperación. La concentración de los nucleótidos se expresó en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso húmedo. Los datos se reportan como medias  $\pm$  error estándar. Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes,  $p < 0.05$ . Reposo (n=25), agotados, (n=13), recuperación (n=21). CEA: carga energética adenílica, ArgP: arginin fosfato.

En la hemolinfa la concentración de glucosa aumentó 44% con respecto al grupo control después del periodo de recuperación de una hora ( $p < 0.05$ ), mientras que el valor observado inmediatamente después de la actividad física intensa no fue estadísticamente diferente al observado en el grupo control (Fig. 3A). En contraste, la concentración de lactato aumentó 4.9 veces después del periodo de actividad física intensa ( $p > 0.05$ ) y permaneció elevado después del periodo de recuperación (Fig. 3B). No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína, hemocianina, ni triglicéridos en la hemolinfa. La composición bioquímica del hepatopáncreas y del músculo no fue afectada significativamente durante la respuesta de escape, aunque la concentración de glucógeno disminuyó en un 25% en el grupo agotados con respecto al grupo control ( $p > 0.05$ ) (Tabla XVI).

**Tabla XVI.** Variables metabólicas cuantificadas en plasma, hepatopáncreas y músculo en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en reposo, después de realizar flexiones abdominales hasta un estado de agotamiento y después de una hora de recuperación.

	<b>Reposo (n=10)</b>	<b>Agotados (n=11)</b>	<b>Recuperación (n=11)</b>
<b>Plasma</b>			
Proteínas totales (mg mL <sup>-1</sup> )	151.3 ± 10.5	177.5 ± 8.66	165.5 ± 10.24
Hemocianina (mg mL <sup>-1</sup> )	90.4 ± 7.70	97.4 ± 7.02	96.2 ± 5.96
Triglicéridos (mg dL <sup>-1</sup> )	59.4 ± 7.78	53.0 ± 5.47	52.5 ± 3.58
<b>Hepatopáncreas</b>			
Proteínas totales (mg g <sup>-1</sup> )	141.2 ± 17.1	158.67 ± 26.6	128.0 ± 14.8
Triglicéridos (mg g <sup>-1</sup> )	50.6 ± 7.15	47.7 ± 17.9	57.4 ± 9.73
Glucógeno (mg g <sup>-1</sup> )	13.2 ± 3.67	10.9 ± 2.39	13.1 ± 3.45
Lactato (mg g <sup>-1</sup> )	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.04
<b>Músculo</b>			
Proteínas totales (mg g <sup>-1</sup> )	594.2 ± 46.9	591.6 ± 35.8	637.7 ± 27.4
Glucógeno (mg g <sup>-1</sup> )	5.37 ± 0.64	4.01 ± 0.80	4.66 ± 0.84
Lactato (mg g <sup>-1</sup> )	5.28 ± 0.53	5.82 ± 0.45	4.41 ± 0.28

En hepatopáncreas y músculo, todas las concentraciones se expresaron en mg g<sup>-1</sup> de peso seco. Los resultados se reportaron como medias ± error estándar. Valores dentro de la misma fila con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3.** (A) Glucosa y (B) lactato (mg dL<sup>-1</sup>) en plasma del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en reposo, después de realizar flexiones abdominales repetidas hasta un estado de agotamiento por fatiga muscular, y después de una hora de recuperación. Los datos se reportan como medias  $\pm$  error estándar. Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes,  $p < 0.05$ . Reposo (n=10), agotados, (n=11), recuperación (n= 11).



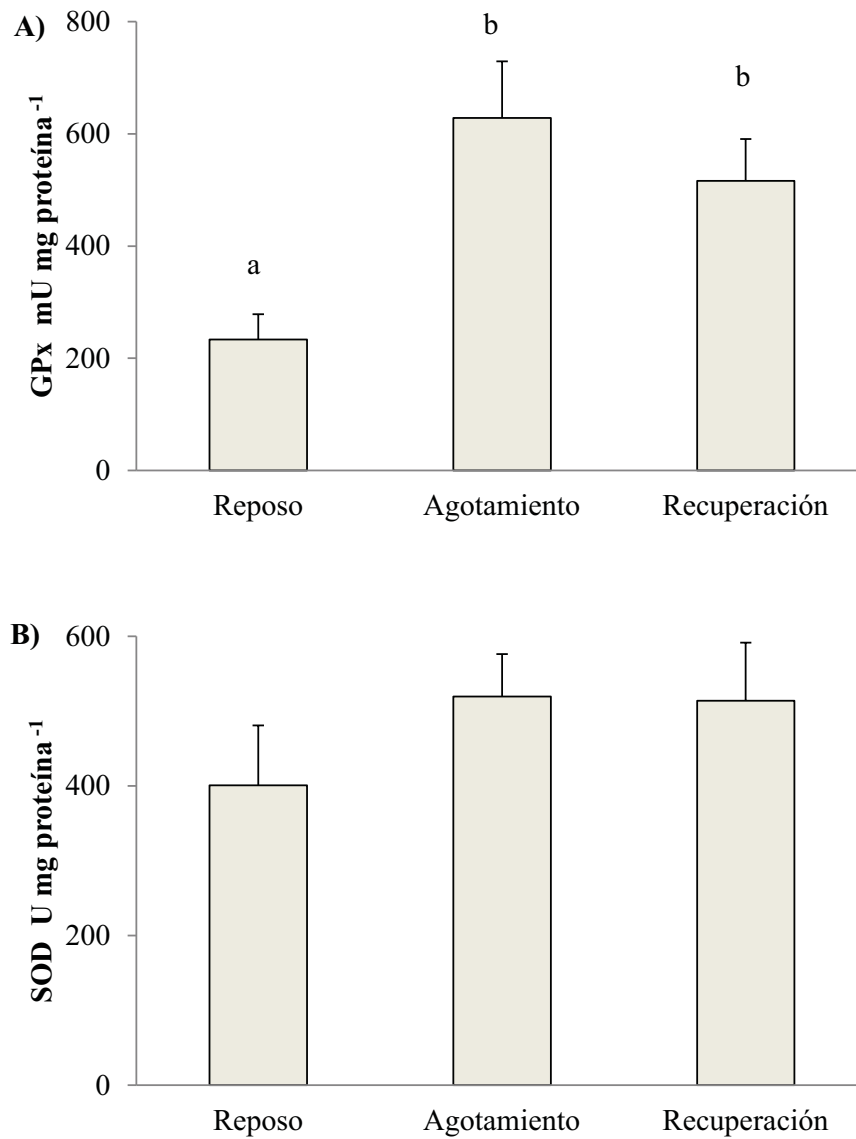
### 7.2.3 Estrés oxidativo

La actividad de GPx en músculo aumentó significativamente un 168% en los camarones agotados ( $p < 0.05$ ) y se mantuvo elevado en el grupo recuperado siendo mayor que lo encontrado en el grupo control ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4A). La actividad de la SOD incrementó no significativamente, tanto en camarones agotados ( $p > 0.05$ ) como recuperados ( $p > 0.05$ ) con respecto al grupo control (Fig. 4B). La actividad de CAT en el músculo estuvo por debajo del límite de detección con la metodología utilizada, mientras que en el hepatopáncreas no se observaron cambios significativos entre los grupos (Tabla XVII). No se observaron diferencias significativas en la tasa de producción de  $O_2^{\bullet-}$ , los niveles de carbonilos proteicos en el músculo abdominal, ni en los niveles de TBARS en músculo y en hepatopáncreas por la respuesta de escape.

**Tabla XVII.** Indicadores de estrés oxidativo en músculo y hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en reposo, después de la respuesta de escape y después de una hora de recuperación.

	<b>Reposo (n=10)</b>	<b>Agotados (n=11)</b>	<b>Recuperación (n=11)</b>
<i>Músculo</i>			
$O_2^{\bullet-}$ (nmoles $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ )*	0.004 $\pm$ 0.001	0.006 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.001
TBARS (nmol $\text{mg}$ proteína $^{-1}$ )	0.74 $\pm$ 0.10	0.66 $\pm$ 0.10	0.66 $\pm$ 0.08
Carbonilos proteicos (nmoles $\text{mg}^{-1}$ )	23.9 $\pm$ 7.13	16.3 $\pm$ 1.62	16.2 $\pm$ 2.21
<i>Hepatopáncreas</i>			
CAT (U $\text{mg}$ proteína $^{-1}$ )	211.1 $\pm$ 49.33	230.9 $\pm$ 42.8	180.8 $\pm$ 32.8
TBARS (nmol $\text{mg}^{-1}$ proteína)	1.68 $\pm$ 0.16	1.59 $\pm$ 0.21	153 $\pm$ 0.19

\*en base húmeda. Los resultados se reportaron como medias  $\pm$  error estándar. Valores dentro de la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes,  $p < 0.05$ .  $O_2^{\bullet-}$ : radical superóxido, TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, CAT: catalasa.



**Figura 4.** Actividad de (A) Glutación peroxidasa (GPx, mU mg de proteína<sup>-1</sup>) y (B) superóxido dismutasa (SOD, U mg de proteína<sup>-1</sup>) en músculo del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en reposo, después de realizar flexiones abdominales repetidas hasta un estado de agotamiento, y después de una hora de recuperación. Los datos se reportan como medias  $\pm$  error estándar. Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes,  $p < 0.05$ . Reposo (n=10), agotados, (n=11), recuperación (n=11). SOD: superóxido dismutasa, GPx: glutación peroxidasa.

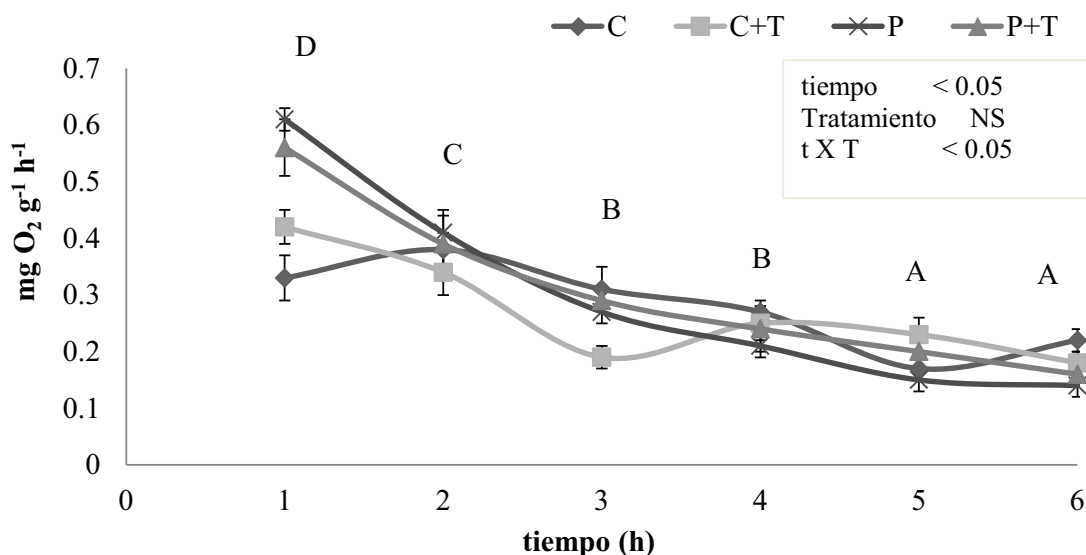
### 7.3 Evaluación del consumo de O<sub>2</sub> posterior a la respuesta de escape

Los organismos control sin transferencia se mostraron más activos al inicio de la medición del OD, probablemente debido a la introducción del electrodo del oxímetro en la pecera o respirómetro. Los organismos control con transferencia, exploraron la pecera o permanecieron en un extremo de ella justo después de que se introdujeron a la pecera. Los organismos del grupo persecución con transferencia realizaron  $39 \pm 1$  flexiones del abdomen en  $38.7 \pm 2.9$  s, después de lo cual los organismos no realizaron flexiones abdominales adicionales durante la transferencia a la pecera. Los organismos cuya respuesta de escape se indujo en la misma pecera (sin transferencia) se comportaron de la misma forma que los perseguidos en el tanque perdiendo la postura o manteniendo el abdomen flexionado. Sin embargo, en este caso no se pudo cuantificar el número de flexiones abdominales dado que estas ocurrieron en la red.

Se observó un efecto significativo del tiempo en el que permanecieron en la pecera, la tasa de consumo de O<sub>2</sub> (MO<sub>2</sub>) durante la primera hora fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) y disminuyó gradualmente hasta alcanzar un mínimo al cabo de 6 horas (Fig. 5). Dicho patrón fue observado en todos los grupos experimentales, a excepción del grupo control sin transferencia (control absoluto) donde se presentó el valor máximo de MO<sub>2</sub> en la segunda hora y posteriormente se observó la misma tendencia que en el resto de los grupos, es decir una disminución gradual del MO<sub>2</sub>. De hecho y tal como lo indica la interacción significativa ( $p < 0.05$ ), el curso temporal fue diferencial en función del grupo experimental, por lo cual se presentan las diferencias entre las medias individuales por grupo y para cada tiempo en la tabla XVIII y se describen las diferencias principales a continuación.

Durante la primera hora, el valor de MO<sub>2</sub> de los organismos de los dos grupos con persecución fue significativamente mayor a la que presentaron los grupos control ( $p < 0.05$ ). Así, el valor de MO<sub>2</sub> más alto se presentó en la primera hora y fue 1.9 veces mayor en el grupo fatiga sin transferencia comparado con en el grupo control sin transferencia. A partir de la segunda hora, ya no se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales y a partir de la tercera hora ya no se observan diferencias significativas con respecto al MO<sub>2</sub> final al cabo de 6 horas para ninguno de los grupos. De lo anterior, es importante señalar que la mayor caída en el MO<sub>2</sub> (30 y 33% para los grupos sin y con transferencia, respectivamente) ocurre entre la primera y

segunda hora para los dos grupos con persecución ( $p < 0.05$ ), mientras que para los grupos control es más variable dado que se presentan algunas oscilaciones como parte de la disminución gradual.



**Figura 5.** Tasa de consumo de  $O_2$  ( $mg O_2 g^{-1} h^{-1}$ ) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante un periodo de recuperación después de la respuesta de escape inducida por persecución hasta alcanzar el agotamiento por fatiga muscular. Se muestran los resultados del ANOVA bifactorial (tiempo x Tratamiento) en el cuadro insertado en la figura. Se reportan las diferencias entre medias globales por tiempo, independientemente del tratamiento con letras mayúsculas: tiempos con letras diferentes son significativamente diferentes. Dado que la interacción entre ambos factores también fue significativa, véase Tabla XVIII para la comparación de medias individuales,  $p < 0.05$ . C: Control sin transferencia (control absoluto) ( $n=11$ ), C+T: control con transferencia de la tina al respirómetro ( $n=12$ ), P: Persecución dentro del respirómetro sin transferencia ( $n=15$ ), P+T: Persecución con transferencia de la tina al respirómetro ( $n=12$ ).

**Tabla XVIII.** Tasa de consumo de  $O_2$  ( $mg O_2 g^{-1} h^{-1}$ ) del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* durante un periodo de recuperación después de la respuesta de escape inducida por persecución hasta alcanzar el agotamiento por fatiga muscular.

	Tasa de consumo de $O_2$ ( $mg O_2 g^{-1} h^{-1}$ )					
	Hora 1	Hora 2	Hora 3	Hora 4	Hora 5	Hora 6
C	$0.33 \pm 0.04^{bcde}$	$0.38 \pm 0.03^{de}$	$0.31 \pm 0.04^{bcde}$	$0.27 \pm 0.02^{abcd}$	$0.17 \pm 0.02^a$	$0.22 \pm 0.02^{abc}$
C+T	$0.42 \pm 0.03^e$	$0.34 \pm 0.04^{cde}$	$0.19 \pm 0.02^{ab}$	$0.25 \pm 0.03^{abcd}$	$0.23 \pm 0.03^{abc}$	$0.18 \pm 0.02^{ab}$
P	$0.61 \pm 0.02^f$	$0.41 \pm 0.03^e$	$0.27 \pm 0.02^{abcd}$	$0.21 \pm 0.02^{abc}$	$0.15 \pm 0.02^a$	$0.14 \pm 0.02^a$
P+T	$0.56 \pm 0.05^f$	$0.39 \pm 0.06^{de}$	$0.29 \pm 0.02^{abcde}$	$0.24 \pm 0.04^{abc}$	$0.20 \pm 0.04^{abc}$	$0.16 \pm 0.02^a$

A partir del ANOVA bifactorial y la comparación de medias por la prueba Newman-Keuls, medias  $\pm$  error estándar con letras diferentes son estadísticamente diferentes entre sí,  $p < 0.05$ . C: Control sin transferencia ( $n=11$ ); C+T: control con transferencia de la tina al respirómetro ( $n=12$ ); P: Persecución dentro del respirómetro sin transferencia ( $n=15$ ); P+T: Persecución con transferencia de la tina al respirómetro ( $n=12$ ).

## **8. DISCUSIÓN**

### **8. 1 Estandarización de la obtención y del procesamiento de muestras para la cuantificación de la carga energética adenínica y los niveles de ArgP en camarón**

#### **8.1.1 Comparación de la congelación con nitrógeno líquido y la disección rápida a temperatura ambiente**

En ambos grupos, congelación con nitrógeno líquido y la disección rápida a temperatura ambiente, se observaron valores de CEA por encima de 0.9. Lo anterior concuerda con los valores reportados para organismos no estresados y en una condición general óptima (0.8-0.9) (Ivanovici, 1980b; Marazza et al., 1996). Los resultados concuerdan también con los valores reportados en muestras no degradadas (Gornik et al., 2008). En el caracol *Pyrazus ebeninus* no se encontraron diferencias entre muestras que se procesaron después de diferentes tiempos (1 a 4 min) transcurridos entre la disección y el congelamiento de la muestra; sin embargo, se observó una disminución no significativa de 0.1 en la CEA entre los 2 y 4 min (Ivanovici, 1980b). En el mismo estudio no se encontró una correlación significativa entre los valores de CEA o NAT y el tiempo durante el cual se realizó la disección (35 a los 73 s) de los organismos (Ivanovici, 1980b).

Generalmente se asume que la congelación inmediata, por inmersión en nitrógeno líquido o sujetando a los organismos con pinzas enfriadas en nitrógeno líquido, es necesaria para manipular a los crustáceos decápodos, aunque en la mayoría de los casos no se comparan los resultados entre tejido congelado y tejido fresco (Thébault et al., 1994; Marazza et al., 1996; Morris et al., 2005). En este sentido, la evaluación del efecto de la congelación en la concentración de los nucleótidos se consideró necesaria porque los camarones peneidos responden al intento de captura con la respuesta de escape y se ha reportado que en estos organismos la CEA disminuye por efecto de las flexiones del músculo abdominal (Onnen y Zebe, 1983; Gäde, 1984; Thébault et al., 1994; Morris y Adamczewska, 2002). En el camarón *Palaemonetes paludosis* se detectó un valor menor de la CEA, principalmente por un aumento en la concentración de AMP, en una porción de músculo disectado en fresco y congelado después de 60 s, en comparación al valor obtenido de músculo de organismos que se congelaron enteros inmediatamente o de músculo del abdomen congelado después de separarlo del cefalotórax en 20 s. (Giesy et al., 1981). Además, se reportó que el camarón

*Marsupenaeus japonicus* debe sumergirse entero en nitrógeno líquido para evitar el incremento de la concentración de AMP, mientras que, en el mismo estudio, se encontró que en el caso de *Penaeus monodon* no se afectaron los niveles de nucleótidos cuando el cefalotórax se separó del abdomen y después este último se congeló (Paterson, 1993).

Con base en los resultados del presente estudio, se puede asumir que, en el caso de *L. vannamei*, no se observa un efecto significativo en la concentración de nucleótidos al separar el cefalotórax del abdomen antes de congelar este último, incluso, una porción del músculo abdominal puede ser tomada del camarón vivo, siempre y cuando el procedimiento sea rápido y la muestra sea homogenizada en ácido inmediatamente. Además, no se observó una diferencia en la concentración de AMP o IMP en las muestras tomadas del tejido que no se congeló en comparación con el tejido congelado, lo que confirma que no hubo degradación del ATP.

En otros organismos modelo, se concluyó que en cerebro de ratón la degradación de los nucleótidos adenílicos y de los fosfágenos ocurrió durante la inmersión en nitrógeno líquido del cuerpo completo del ratón, debido al desarrollo de hipoxia arterial antes de que el tejido se congelara (Pontén et al., 1973). A diferencia de los mamíferos, no parece probable que lo anterior ocurra en invertebrados acuáticos debido a su menor metabolismo y a su mayor tolerancia, en general, a condiciones de hipoxia. Sin embargo, se encontraron valores menores de CEA en rebanadas congeladas de cerebro de rata con respecto a rebanadas “frescas” (no congeladas) (zur Nedden et al., 2009); los autores de dicho estudio sugirieron que la degradación del ATP probablemente ocurrió debido a la descongelación de la muestra durante su manipulación y homogenización. Por lo anterior, y con base en el presente estudio, se recomienda tener especial cuidado al manejar el "polvo criogénico" del tejido, ya que éste se descongela rápidamente, aún más que el tejido entero, o bien que este polvo se tenga siempre en nitrógeno líquido.

### **8.1.2 Efecto de los diferentes métodos enfriamiento de los organismos para su muestreo**

Aunque los resultados de la sección 7.1.1. indican que muestras recién obtenidas deben ser inmediatamente procesadas o congeladas para su procesamiento posterior, la experiencia indica que realizar esto en cultivos de camarón en granjas o en el ambiente natural de los camarones no siempre es posible o viable. Una alternativa es bajar la

temperatura de los camarones como ocurre durante una cosecha y almacenarlos posteriormente en congeladores a -20 o -30°C disponibles a pie de granja o en barcos camaroneros por horas o días hasta su traslado o procesamiento *in situ*. Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó la influencia de los diferentes procedimientos de enfriamiento sobre la concentración de los nucleótidos y ArgP.

La disminución drástica del ATP, CEA y ArgP observada en el grupo capturado de forma masiva, expuesto al aire y posteriormente congelado con nitrógeno líquido, puede estar asociado precisamente a la exposición al aire: se sabe que la hipoxia puede dar lugar a la disminución de la CEA y la concentración ArgP en diferentes crustáceos, aunque este efecto se ha reportado en periodos de tiempo más largos que el aquí estudiado (Gåde, 1984; Morris y Callaghan, 1998; Abe et al., 2007). En *P. monodon* se reportó una disminución de la CEA de 0.90 a 0.67 en organismos almacenados en aserrín a 12°C por 12 horas (Paterson, 1993). En *Nephrops norvegicus* expuestos al aire por 2 horas, se observó que la CEA disminuyó de 0.86 a 0.7, mientras que la concentración de ArgP disminuyó en un 65% (Gornik et al., 2010). La disminución de los valores de CEA y la concentración de ArgP en un periodo de tiempo menor (< 3 min) a los estudios arriba mencionados podría estar relacionado a que, en las condiciones de la presente tesis se tuvieron factores adicionales a la hipoxia por exposición al aire, como la respuesta de escape por flexiones del abdomen y el hacinamiento en la red. Sin embargo, en los tratamientos de agua a 7°C y la cama de hielo, los organismos se transfirieron de forma inmediata después de que se sacaron del tanque, por lo que deben ser comparados con el primer grupo en el que los organismos se congelaron de forma individual. El menor valor de la CEA en estos dos tratamientos sugiere que los procedimientos para el muestreo de camarones no son apropiados para el análisis de nucleótidos. La menor concentración de ATP (de 50 y 73%) en camarones mantenidos en agua fría y cama de hielo, respectivamente, fue similar a lo obtenido en el pez *Sparus aurata* en el que el ATP disminuyó 50% en peces inmersos en hielo por 30 min en comparación con peces disectados en fresco (Mendes et al., 2001). La disminución del ATP y el aumento de AMP e IMP durante la etapa post-mortem son efectos típicos reportados en esta etapa en los organismos marinos, incluso si éstos se mantienen a 0°C, aunque dichos efectos pueden observarse después de horas o días (Matsumoto y Yamanaka., 1990; Mendes et al., 2001). El aumento de la concentración

de IMP que resulta de la desaminación del AMP ocurre por acción de la AMP desaminasa sobre este último (Raffin y Thébault, 1991), y se ha reportado que esta enzima tiene mucho menor actividad en invertebrados con respecto a vertebrados (Lazou, 1989; Raffin y Thébault, 1991). A pesar de esta baja actividad en invertebrados, el aumento de la concentración de IMP se ha reportado no sólo en condiciones post-mortem, sino también en crustáceos vivos expuestos a condiciones de estrés, tales como la exposición al aire (Paterson, 1993) y la captura comercial (Albalat et al., 2009). En otros casos, la concentración de IMP estuvo por debajo del límite de detección en organismos estresados por la respuesta de escape y la exposición al aire (Gornik et al., 2010), lo cual podría indicar que el efecto depende de la duración o intensidad del estrés. Esto podría explicar el mayor nivel de IMP encontrado en los camarones mantenidos a 7°C o en una cama de hielo por 15 min en comparación con los organismos hacinados en una red y expuestos al aire por aproximadamente 3 min. En cualquier caso, los cambios en los niveles de los nucleótidos observados en el presente trabajo pueden estar asociados a los diferentes tipos de estímulos estresores (exposición al aire, respuesta de escape continua, o el choque de frío), más que a la descomposición del camarón, especialmente durante el corto periodo de tiempo que duraron estas condiciones. El valor más bajo de CEA y de la concentración de ATP junto con él la mayor concentración de AMP se encontró en el grupo mantenido en una cama de hielo; la diferencia con el grupo mantenido en agua a 7°C podría atribuirse a una menor conductividad térmica del aire con respecto al agua, así como a un mayor estrés en general por la exposición al aire.

Resultados no mostrados en el presente trabajo indican que camarones almacenados por dos meses a -20°C que sufrieron un ciclo de descongelación-congelación tuvieron valores de CEA de  $0.30 \pm 0.03$ , y las siguientes concentraciones ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  músculo en base húmeda) de ATP ( $0.04 \pm 0.01$ ), ADP ( $0.34 \pm 0.04$ ), AMP ( $0.37 \pm 0.15$ ), NAT ( $0.75 \pm 0.20$ ) e IMP ( $6.95 \pm 1.17$ ). Estos valores, especialmente los bajos valores de CEA, de concentración de ATP y NAT así como las altas concentraciones del IMP reflejan un proceso de descomposición similar a los reportados en otros estudios (Matsumoto y Yamakana, 1990) y que son diferentes de los valores obtenidos en los camarones enfriados en hielo o en agua.



En otro experimento, se introdujeron camarones de forma directa al ultracongelador (-76 °C) y se encontraron valores de CEA de  $0.75 \pm 0.11$ , lo que representa valores menores a los obtenidos en el grupo control del experimento de la sección 7.1.2 (métodos de enfriamiento, tabla de resultados III). Por ello descarta la posibilidad de meter los camarones directamente en congeladores a -20 o -30°C, congeladores que están disponibles cerca de las áreas donde se muestrean o capturan camarones en la práctica y en campo.

A diferencia de los nucleótidos, existen muy pocos estudios que analicen la degradación postmortem de ArgP. Se ha observado una disminución en la concentración de ArgP a lo largo de 3 horas a 10°C en la langosta *N. norvegicus*, siendo el efecto más pronunciado en organismos sometidos previamente a un condición de estrés (e.g. repuesta de escape), dado que en esa condición ya hay una depleción antemortem del fosfágeno (Gornik et al., 2008; Albalat et al.,). Por lo anterior, la disminución de la concentración de ArgP observada en los tres grupos experimentales del presente estudio sugiere que el efecto puede atribuirse al estrés más que a la descomposición. A diferencia del ATP, un estrés adicional en los organismos mantenidos en hielo no causa degradación más acentuada de ArgP.

### **8.1.3 Efecto del almacenamiento prolongado a -76°C en la concentración de los diferentes nucleótidos y en la carga energética adenílica en *L. vannamei***

Con base en los datos obtenidos en el presente estudio, se puede sugerir que, por el tiempo evaluado (hasta 23 meses), no hay una degradación significativa de los nucleótidos adenílicos en camarones por congelamiento en nitrógeno líquido y posterior almacenamiento a -76°C. Lo anterior ofrece una ventaja para el muestreo de una gran cantidad de organismos, que pueden ser almacenados y analizados posteriormente.

El congelamiento de crustáceos completos durante el muestreo y su posterior almacenamiento es una práctica común para el análisis subsecuente de nucleótidos; sin embargo, no se especifica en general por cuánto tiempo las muestras permanecen almacenadas ya sea en nitrógeno líquido a -196°C (Giesy et al., 1981; Moal et al., 1989) o bien a -80°C (Thomas et al., 2000). No hay reportes acerca de un posible efecto del tiempo de almacenamiento en los nucleótidos adenílicos. La información disponible acerca de la estabilidad de los nucleótidos específicamente de crustáceos almacenados

proviene de estudios a temperaturas cercanas a los 0°C que simulan el almacenamiento comercial (Shimada et al., 2000, Albalat et al., 2011). En el caso particular de peneidos, la concentración de ATP en *M. japonicus* llega casi a 0 después de 4 días de almacenamiento a -1°C (Matsumoto y Yamakana, 1990). Se sabe que la pérdida inicial de calidad de organismos acuáticos es causada principalmente por cambios autolíticos post-mortem que conllevan a la degradación de los nucleótidos adenílicos y otros metabolitos (Pacheco-Aguilar et al., 2008). Sin embargo, la actividad enzimática a temperaturas menores a 0°C es reducida, entre otras razones, por una menor interacción molecular, la desnaturalización de proteínas y un aumento de la viscosidad. Se ha señalado que por debajo de 0°C hay aún cierta actividad enzimática y que la cinética molecular no es detenida completamente hasta temperaturas por debajo de -65°C (More et al., 1995; Georlette et al., 2004; Sallam, 2007). Por otro lado, se ha reportado que el ATP se descompone o degrada a partir de temperaturas de -39°C (Jessen y Capplen, 1996, estudio citado en Mendes et al., 2001). Sin embargo, Thomas et al. (2000) mencionan que el almacenamiento a temperaturas por debajo de -40°C detiene el catabolismo del ATP definitivamente, aunque no presentan datos que comprueben lo anterior.

#### **8.1.4 Diferentes métodos de homogenización para el procesamiento de tejido**

Además del muestreo adecuado y la correcta conservación de la muestra, el procesamiento inicial de la muestra también es un aspecto crucial para determinar la concentración de los nucleótidos adenílicos de los camarones en una determinada condición. De los tres equipos utilizados, cada uno tiene sus ventajas y desventajas. El homogenizador mecánico de esferas (modelo FastPrep24, MP Biomedicals) procesa 24 muestras a la vez y, tanto para este equipo como para el homogenizador mecánico de flecha (modelo Tempest IQ2, The VirTis Company), el nitrógeno líquido no es necesario. En contraste, la operación del molino mezclador (modelo MM400, Retsch) requiere nitrógeno líquido; y la ventaja que ofrece es que se obtiene un polvo de tejido homogéneo lo que elimina el problema de procesar porciones de tejido con diferencias anatómicas en función de su localización; además el polvo puede ser utilizado para otros análisis a partir de la misma muestra homogénea, sin tener que procesar nuevamente otra muestra de tejido.

Los resultados indican que el homogenizador mecánico de esferas debe descartarse para el análisis de nucleótidos, dado que el tejido se mantiene a temperatura ambiente durante la homogenización, a diferencia de los otros dos equipos utilizados, con lo cual pueden tener lugar las reacciones enzimáticas de hidrólisis de ATP en el tejido antes de que este sea completamente disgregado. En el caso del homogenizador mecánico de flecha los tubos de ensayo en los que se homogeniza la muestra se mantienen en un baño de hielo. Aunque la homogenización del tejido se realiza en condiciones ácidas, lo que precipita las proteínas e inactiva los procesos enzimáticos, la temperatura sigue siendo un factor importante. Además, es posible que ocurra una menor disgregación del tejido y, por tanto, menor penetración del ácido en el mismo durante el proceso mecánico. Entre los pocos estudios que analizan la influencia del procesamiento de la muestra, Moal et al. (1989) demostraron la ventaja de primero moler el tejido de ostras con un molino mezclador para obtener polvo de tejido, comparado con la homogenización directa de tejido congelado de ostión con un Potter, lo que resultó en valores menores de CEA. Por otro lado, Thomas et al. (2000) demostraron la labilidad del ATP durante el procesamiento, al obtener valores menores de ATP en muestras de pez maceradas con un bisturí en una caja Petri sobre hielo en comparación a muestras procesadas en condiciones criogénicas.

Una comparación de los niveles de CEA, ADP y AMP en tejidos de ostión después de su procesamiento con el homogenizador mecánico de flecha y el molino mezclador arrojó que no hay diferencias entre los dos equipos, aunque las marcas de éstos fueron diferentes a las de los equipos utilizados en el presente estudio, (Racotta y Moal, resultados no publicados). Sin embargo, cabe señalar que la diferencia en los valores de CEA al usar estos dos equipos en el presente estudio es menor a lo reportado por ellos en ostión. Además los valores obtenidos en esta comparación de los dos equipos se encuentran dentro del rango de variación observado en camarones control en los diferentes experimentos de este estudio. El homogenizador mecánico de flecha se utilizó en los siguientes experimentos: comparación de la congelación con nitrógeno líquido y la disección a temperatura ambiente, diferentes métodos de enfriamiento de organismos durante el muestreo y almacenamiento prolongado de organismos. El molino mezclador se utilizó para procesar las muestras de los siguientes experimentos: condiciones de aclimatación en el laboratorio, uso de anestesia durante el muestreo,

evaluación del efecto de la obtención de hemolinfa y evaluación del estado energético en la respuesta de escape. Con ambos equipos se obtuvieron valores de CEA mayores a 0.9 y por tanto, se asume que no ocurrió degradación de ATP durante el procesamiento de las muestras. Por otro lado, los camarones utilizados en la comparación de los equipos para la homogenización de tejido fueron los transferidos de estanque un día antes de ser analizados, donde se observaron valores de CEA y ATP de 0.9 y 9.4, respectivamente, cuando se procesaron con un molino mezclador, y estos valores son intermedios a los obtenidos en la prueba donde se utilizaron los dos equipos (entre 0.87 y 0.95 para CEA y entre 8.2 y 9.8 para ATP). Lo anterior sugiere que la diferencia entre los dos equipos puede deberse parcialmente a cierta variación biológica, mientras que la diferencia atribuida al procesamiento de la muestra podría estar relacionada al calentamiento de la muestra en el homogenizador mecánico de flecha, lo que podría explicar la mayor variabilidad observada en este equipo que en el molino mezclador. Por todo lo anterior, ambos equipos pueden ser utilizados para este tipo de análisis, en función de su disponibilidad.

### **8.1.5 Condiciones óptimas de los organismos para la obtención de muestras**

#### **8.1.5.1 Condiciones de aclimatación en el laboratorio**

En las condiciones utilizadas inicialmente en el laboratorio (tanques de 500 L, fondo de fondo blanco y densidad de 70 camarones  $m^{-2}$ ), se obtuvieron valores relativamente bajos de CEA de los camarones. Por ello se decidió comparar camarones bajo esas condiciones con camarones de estanques de mareas y con camarones mantenidos en tanques al interior del laboratorio pero en condiciones menos estresantes (tanques 5,000 L, fondo negro y densidad de 20 camarones  $m^{-2}$ ).

En una comparación entre camarones (*Palaemonetes paludosis*) mantenidos 3 días en el laboratorio en comparación con organismos silvestres, se encontraron menores concentraciones de de ATP y NAT en los organismos aclimatados por tres días en el laboratorio, aunque los valores de CEA no fueron diferentes (Giesy et al., 1981). En contraste, la transferencia del gasterópodo *Pyrazus ebeninus* de su medio natural a las condiciones del laboratorio hasta por 6 semanas no causó un efecto significativo en los valores de CEA ni en NAT (Ivanovici, 1980b). Se pueden sugerir distintas explicaciones a las diferencias encontradas en el presente estudio entre organismos de

estanque y los mantenidos al interior de un laboratorio; Una de estas explicaciones podría ser la disponibilidad de alimento, dado que se ha reportado que la CEA en el ostión japonés *Crassostrea gigas* depende del nivel trófico del medio ambiente (Moal et al., 1991). En el caso del presente estudio, la mayor CEA en camarones de estanques podría deberse al alimento natural disponible en los estanques, y en el caso de tanques con menor densidad a una mayor disponibilidad de alimento. Otra posible razón es el estrés crónico debido al cautiverio en tanques al interior, especialmente en los tanques que eran de claros y la mayor densidad de organismos. Ello concuerda con lo propuesto por Ivanovici (1980a), quien propuso a la CEA como un indicador de estrés crónico, como sería una alta densidad y el tipo de tanque en el que estuvieron los camarones. Sin embargo, en un estudio paralelo (Apún-Molina, comunicación personal), no se encontraron diferencias significativas para la CEA, los niveles individuales y totales de nucleótidos, y los niveles de ArgP entre camarones cultivados a 20 y 100 organismos  $m^{-2}$ . Por otro lado, diferentes estudios han asociado mayores concentraciones de ATP y ArgP a altas demandas energéticas:

- i) La variación estacional de la concentración de ATP se relacionó a un aumento en la actividad motora que ocurre durante el periodo reproductivo de *Procambarus acutus* (Dickson y Giesy, 1982a).
- ii) Al comparar los niveles de nucleótidos y CEA en dos especies de langostinos en ayuno prolongado, se asoció el aumento de la concentración de ATP de *Procambarus clarkii* que habita la superficie a una mayor actividad motora como respuesta un estrés nutricional, mientras que *Orconectes inermis* que habitan en cuevas no presentó cambios, lo anterior se atribuyó a un menor metabolismo del segundo debido a su hábitat (Dickson y Giesy, 1982b).
- iii) La mayor concentración de ATP en *Palaemon elegans* en comparación con una especie cercana *Palaemon serratus* se asoció a una mayor tolerancia de *P. elegans* a hipoxia ambiental (Thébault et al., 1994).

Puede especularse que los camarones en los estanques de mareas tuvieron una mayor tasa metabólica en comparación a los camarones mantenidos al interior del laboratorio en condiciones de hacinamiento, aunque se sugieren más estudios para confirmar esta hipótesis.

Cualquiera que haya sido la razón particular de los bajos valores de CEA y de la concentración de ArgP en los camarones mantenidos en los tanques de 500 L y fondo claro (estrés, menos alimento o menos actividad locomotora por el hacinamiento) en comparación con los organismos que se transfirieron de estanques y se muestrearon al día siguiente, se asume que una recuperación parcial de esas variables tuvo lugar después de que se removió el estresor al transferirlos a un contenedor de mayor volumen (Ivanovici, 1980a; Marazza et al., 1996) o que se aumentó la cantidad de alimento comercial suministrado.

#### **8.1.5.2 Evaluación del uso de anestesia durante el muestreo**

Los organismos control de experimentos previos (datos preliminares, coeficiente de variación de 72%) mostraron una alta dispersión de la concentración de ArgP en puede deberse al número de flexiones abdominales que realiza el camarón como respuesta ante su manejo al capturarlo para su muestreo. A pesar de que esta respuesta se intentó minimizar muestreando los camarones de forma individual en una jaula y realizando el muestreo con las precauciones necesarias para evitar la respuesta de escape, algunos organismos si efectuaron de 1 a 3 flexiones del abdomen antes de ser capturados. Zamora-Méndez (2012) evaluó el uso del eugenol como anestésico en *L. vannamei* muestreados a pie de un estanque de mareas y reportó que el uso de este anestésico evitó la utilización del ATP y de la ArgP como fuentes de energía involucradas en la respuesta de escape. Por lo anterior, se evaluó el uso del eugenol como anestésico bajo condiciones controladas, en el laboratorio, y su posible efecto sobre la dispersión de los datos y su confiabilidad en la obtención de valores basales. Zamora-Méndez (2012) utilizó una concentración de eugenol (100 a 120 mg L<sup>-1</sup>) en organismos con un peso entre 20 y 24 g, pero la utilizada en el presente estudio fue mayor, aunque dentro del rango utilizado en otros estudios con crustáceos; a saber entre 100 y 200 mg L<sup>-1</sup> para el camarón *Penaeus semisulcatus* (1.80-2.10 g) (Soltani et al., 2004) y 300 mg L<sup>-1</sup> en el caso de *Macrobrachium rosenbergii* (2.01 ± 0.1 g) (Coyle et al., 2005).

Las diferencias encontradas en la CEA y la concentración de ArgP de los diferentes grupos pueden atribuirse al efecto separado o combinado de las variables (anestesia y sección), que causaron que los camarones realizaran un menor número de flexiones abdominales. Por una parte, los organismos anestesiados realizaron un número menor

de flexiones abdominales, lo que se refleja en mayores concentraciones de nucleótidos y ArgP, mientras que en el caso de los organismos a los que se les realizó la sección músculo abdominal, éstos presentaron mayores valores tanto de CEA como de la concentración de ArgP. Como se mencionó en los resultados (sección 7.1.5.2), en el caso de los nucleótidos la interacción significativa entre la anestesia y la sección se puede explicar por el menor valor de CEA (y la mayor concentración de ADP y AMP) obtenido en los organismos no anestesiados y no seccionados, lo cual coincide con un menor número de flexiones en los organismos anestesiados. Si bien parece lógico que los organismos anestesiados realizaron menos flexiones del abdomen y que éstas se presentaron sobre todo en respuesta al estímulo de la aguja, es menos claro cómo el efecto de la sección puede influenciar el número de flexiones abdominales, y aunque también se presentó un menor número de flexiones en los organismos congelados enteros, el efecto no fue significativo a diferencia de la anestesia. Sin embargo, el registro del número de flexiones se hizo antes de la inmersión en nitrógeno líquido, donde muchos de los organismos "enteros" presentan cierta respuesta de escape con flexiones del abdomen dentro del tanque de nitrógeno líquido, e incluso al extraer a los camarones del nitrógeno líquido la mayoría tienen el abdomen flexionado. Aunque la interacción no fue significativa, en el caso de los niveles de ATP y ArgP, la tendencia es muy similar con los mayores niveles en anestesiados seccionados y los menores niveles sin anestesia y congelados enteros. Con base en estos resultados, se podría sugerir que es factible la obtención de hemolinfa en los mismos organismos en los que se obtenga la muestra para cuantificar nucleótidos y fosfágenos, siempre y cuando los organismos se anestesien. La sección del primer segmento abdominal es, además, un procedimiento común para almacenar sólo una parte del camarón que contiene los órganos de interés para análisis posteriores (hepatopáncreas, músculo del primer segmento y branquias). En caso de no ser posible el uso de anestesia por las condiciones de muestreo y si se quiere obtener muestra de hemolinfa, sería recomendable realizar la sección del primer segmento abdominal para evitar la depleción de ArgP y ATP, así como el incremento en la concentración de AMP, que podría verse reflejado en una menor valor de CEA por efecto del estrés de muestreo.

Una menor concentración de triglicéridos en plasma de los camarones congelados enteros sugiere el uso de este combustible para suplir la demanda de energía generada

por el mayor número de flexiones abdominales. La utilización de triglicéridos en *L. vannamei* ante un estrés agudo ha sido reportado en trabajos previos, aunque los resultados son hasta cierto punto controvertidos. Racotta y Palacios (1998) reportaron una disminución en la concentración de los triglicéridos al cabo de 120 min de haber manipulado a los camarones, para extraer hemolinfa e inyectar solución salina. En respuesta a un estrés agudo (captura y confinamiento de organismos por 5 min y exposición al aire por 10 s), no se observaron diferencias en la concentración de los triglicéridos en la hemolinfa después de 1 hora de haber aplicado el estrés (Mercier et al., 2009). Aparicio-Simón et al. (2010) tampoco encontraron diferencia significativa en los niveles de triglicéridos en plasma después de haber manipulado a los organismos por 1 min, aunque hubo cierta disminución en los niveles de esta reserva en hepatopáncreas. Una mayor concentración de glucosa en el hepatopáncreas de los organismos anestesiados puede estar relacionada a una menor liberación de este combustible en la hemolinfa, de acuerdo a una menor demanda del mismo por parte de otros tejidos. Sin embargo, este aumento en la concentración de glucosa no se vio acompañado por cambios en las concentraciones de glucógeno del hepatopáncreas o de la glucosa en hemolinfa, posiblemente porque estos efectos aún en una condición de estrés acentuado son más retardados (Aparicio-Simón et al., 2010; respuesta de escape presente trabajo). Sería necesario evaluar de qué manera el uso de la anestesia podría atenuar la respuesta metabólica de un estrés más pronunciado que el simple muestreo. En *M. rosenbergii* anestesiado y estresado por manipulación durante 30 min, observó la disminución de la concentración del glucógeno en el hepatopáncreas y aumento de la concentración de glucosa en la hemolinfa (Saydmohammed y Pal, 2009).

La concentración de lactato y glucosa en plasma de todos los grupos obtenida en este experimento es similar a la reportada para camarones sin estrés (Racotta y Palacios, 1998; Mercier et al., 2009, Aparicio-Simón et al., 2010; ver también revisión de Zamora-Méndez, 2012). Lo anterior sugiere que el estrés de muestreo fue mínimo, y contribuye a explicar que sólo algunas variables se vieron afectadas, a diferencia de trabajos previos donde la logística del muestreo fue tan compleja que se alcanzó a inducir un aumento en la concentración de lactato en hemolinfa (Aguilar et al., 2012).



### 8.1.5.3 Efecto de la extracción de hemolinfa

Esta prueba se realizó con la idea de tener un antecedente para determinar de forma objetiva si los organismos a los que se les extrae hemolinfa (utilizados para el análisis de los niveles de combustibles y reservas) pueden ser utilizados para analizar los nucleótidos y ArgP en músculo y hepatopáncreas.

El efecto observado en NAT del músculo no puede ser explicado por el número de flexiones del abdomen, porque ambos grupos realizaron un número similar. Otra diferencia entre estos dos grupos es una mayor exposición al aire para tomar la muestra de hemolinfa.

Un efecto similar se observó en *L. vannamei* muestreados en una granja comercial, con una mayor concentración de NAT en organismos a los que se les extrajo hemolinfa, en comparación con organismos a los que no se les extrajo; y el mismo efecto se observó para la CEA y ArgP; se sugirió que al extraer la hemolinfa se perdió cierta cantidad de líquido en el tejido lo cual podría incrementar la concentración de solutos, expresada en este caso en  $\text{mg g}^{-1}$  de peso húmedo (Martínez-Antonio, 2014). Sin embargo, al comparar los niveles de los nucleótidos y sus metabolitos en los organismos sin extracción de hemolinfa por efecto de la pérdida de líquido tisular, se observa una disminución de 13% para la concentración para ATP y ADP, 12% para NAT, 7.5% para la concentración de AMP, 4.3 % para la concentración de ArgP, mientras que la concentración de la hipoxantina fue 18% mayor; por lo que, en caso de ocurrir, la pérdida de líquido tisular, no afectó a estos metabolitos de igual manera o bien hubo un efecto adicional que afectó de manera diferencial la concentración de los nucleótidos. En este sentido, y al igual que para el análisis de la composición bioquímica, hubiera sido deseable calcular las concentraciones de nucleótidos con base en el peso seco, aspecto que no fue posible en el presente estudio dado que no se pueden liofilizar la muestras ni secarlas dado que esto produce degradación de los nucleótidos (Le Coz, 1989). Para verificar lo anterior, se podría comparar el contenido de agua de las muestras obtenidas para el análisis de la composición bioquímica entre camarones con y sin toma de hemolinfa. Sin embargo, los senos hemolinfáticos abdominales a partir de los cuales se obtuvo la muestra de hemolinfa se encuentran en el primer segmento abdominal usado para el análisis de nucleótidos y fosfágenos, mientras que la composición bioquímica se realizó en el segundo segmento abdominal.

Los valores de CEA y ArgP de este experimento (sección 6.1.1.7) son similares a los encontrados en organismos estresados de otras pruebas del presente estudio (que realizaron flexiones del abdomen hasta el agotamiento, que se expusieron al aire por 3 min o a un choque de temperatura por 15 min). Lo anterior sugiere una condición sub-óptima de estos organismos en comparación con los resultados de la condición óptima de los organismos para los muestreos (sección 7.1.3) o bien que hubo cierto estrés no controlado durante o previo al muestreo, aunque no se observó ninguna anomalía aparente en los camarones, como podría ser un estado aletargado o la presencia de signos de alguna enfermedad. Los resultados de este experimento no son del todo concluyentes dado que, si los camarones se encontraban en una condición previa de estrés crónico o agudo, con la consecuente alteración del estado energético, se pudo haber enmascarado el efecto de un estímulo estresor adicional, como lo es la obtención de hemolinfa. De cualquier manera se discuten a continuación los resultados obtenidos a pesar de este posible sesgo.

Una menor CEA en el hepatopáncreas de los organismos a los que se les extrajo hemolinfa se debe principalmente a una menor concentración de ATP en ese grupo, lo que sugiere que la toma de hemolinfa implicó una mayor demanda de energía en este tejido. Un mayor contenido de glucosa en músculo en los organismos a los que se les extrajo hemolinfa podría asociarse al aumento en el uso de energía debido a la contracción muscular que realiza el camarón al inmovilizarlo para la toma de hemolinfa. Dado que este incremento no estuvo asociado con una disminución de la concentración de glucógeno, es posible que la glucosa haya sido captada de la hemolinfa, aspecto que no se pudo verificar en vista que no se hicieron determinaciones en hemolinfa en este experimento.

## **8.2 Evaluación del estado energético y del estrés oxidativo en la respuesta de escape**

### **8.2.1 Respuesta de comportamiento**

El número de flexiones abdominales que realizaron los camarones hasta llegar a un estado de agotamiento fue de 26 a 29 "coletazos" en un periodo de 25 s, lo que es ligeramente menor a lo reportado previamente para otros camarones peneidos: 42 en 9 s el caso de *M. japonicus* (Yu et al., 2009), 37 a 47 en un periodo de 20 s para *P. serratus*

(Thébault et al., 1991; 1997), hasta 60 flexiones en un tiempo no especificado en el caso de *Cherax destructor* (England y Baldwin, 1983), y hasta 66 en un periodo de 59 s para *Orconectes limosus* (Gäde et al., 1984). Algunos de estos estudios caracterizaron dos fases en la respuesta de escape de los decápodos: Por ejemplo, *P. serratus* realizó entre 10 y 40 flexiones rápidas y vigorosas, después de lo cual realizó una serie de flexiones abdominales más débiles, hasta que se alcanzó un estado de agotamiento, en el cual se observó un cambio en el color del músculo abdominal, tornándose blancuzco (Thébault y Raffin, 1991). Cuando la contracción muscular fue inducida por estimulación eléctrica, la serie inicial de flexiones abdominales vigorosas tuvo una frecuencia de 2.5 flexiones  $s^{-1}$ , mientras que las flexiones de la siguiente serie fueron progresivamente menos potentes y frecuentes (1.8 flexiones  $s^{-1}$ ) (Thébault et al., 1997). De forma similar, *C. destructor* realizó en una etapa inicial, de 15 a 30 flexiones rápidas, aunque hubo individuos que realizaron hasta 60 flexiones en total antes de llegar al agotamiento (England y Baldwin, 1999).

### 8.2.2 Metabolismo energético durante la respuesta de escape

La respuesta de escape impone una alta demanda de energía a los músculos que la soportan, en diferentes Phyla como moluscos, artrópodos y vertebrados, esta energía es provista principalmente por fosfágenos y glucólisis anaerobia (England y Baldwin, 1983; Onnen y Zebe, 1983; Gäde, 1984). La concentración de ATP, y en consecuencia la CEA, pueden o no disminuir, en función de la capacidad del organismo para restaurar dicha energía. Por ejemplo, después de inducir flexiones del abdomen por estimulación eléctrica se observó un decremento de la CEA en *P. serratus* pero no en *P. elegans*, lo cual se asoció con una mayor reserva de ArgP y de ATP en la última especie que le permite mayor tolerancia a condiciones de hipoxia, lo cual a su vez se asoció con el hábitat de *P. elegans* en zonas menos profundas que *P. serratus* (Thébault et al., 1994). De forma similar, la concentración de ATP y el nivel de la CEA no cambiaron durante una alta frecuencia (2 contracciones  $s^{-1}$ ) y corta duración (25 s) de "coletazos" en *O. limosus*, mientras que la concentración del ATP y el valor de la CEA disminuyeron significativamente cuando los organismos se estimularon por contacto con un tubo para inducir la respuesta de escape por un periodo de tiempo mayor (59 s), e incluso si la frecuencia de las flexiones abdominales fue menor (1.1 flexiones  $s^{-1}$ ) (Gäde et al.,

1984). La disminución en la concentración de ATP y la CEA, 35 y 18%, respectivamente, observada en el presente estudio es consistente con estudios previos que evaluaron la CEA en organismos que realizaron flexiones del abdomen hasta llegar al agotamiento. Los niveles de ATP y CEA disminuyeron en un 45 y 35% respectivamente, en *Crangon crangon* (Onnen y Zebe, 1983), 40 y 28%, respectivamente, en *C. destructor* (England y Baldwin, 1983), y 67 y 40% respectivamente, en *P. serratus* (Thébault et al., 1997). En cambio, el contenido de ATP fue regulado de forma más estricta y por lo tanto la CEA disminuyó ligeramente (11 y 16% respectivamente) en *O. limosus* dependiendo de la duración de la respuesta de escape (Gäde et al., 1984). A pesar de que la disminución de la CEA se puede atribuir principalmente a la disminución en la concentración del ATP, el aumento en la concentración de ADP y principalmente del AMP pudo contribuir también a la disminución de la CEA.

Dichas variaciones en la concentración de los nucleótidos de adenina, junto con los niveles constantes de NAT, sugieren que la restauración del ATP por vía de la adenilato cinasa a partir del ADP sin gasto de energía (Raffin y Thébault, 1996) no fue activada de manera importante, ya que si éste hubiera sido el caso, se esperaría haber encontrado la acumulación de AMP y/o IMP, vía AMP desaminasa, con una disminución de los NAT, como fue reportado para *P. serratus* después de la respuesta de escape (Raffin y Thébault, 1996; Thébault et al., 1997) o en la trucha arcoiris (aumento de la concentración de IMP) después de realizar actividad física hasta alcanzar un estado de agotamiento (Wang et al., 1994).

En el presente estudio los niveles NAT disminuyeron en  $0.77 \mu\text{mol g}^{-1}$ , aunque no fue significativo, lo cual es considerablemente mayor que el aumento de  $0.07 \mu\text{mol g}^{-1}$  en la concentración de IMP, por lo que probablemente ocurrió el metabolismo de IMP a inosina e hipoxantina (Lomax y Henderson, 1973).

La contribución relativa de energía a partir del uso de fosfágenos comparado con el metabolismo anaerobio se ha abordado previamente en estudios que analizaron la aportación de energía durante la respuesta de escape (England y Baldwin, 1983; Onnen y Zebe, 1983; Gäde, 1984). En el presente estudio, la disminución en un 75% en un periodo de tiempo tan corto como 25 sugiere la utilización de ArgP, lo cual concuerda con la disminución de 49 a 98% reportada en la literatura en otros decápodos

estimulados hasta el de agotamiento (England y Baldwin, 1983; Onnen y Zebe, 1983; Gäde, 1984; Thébault y Raffin, 1991; Thébault et al., 1994; Thébault et al., 1997). La contribución de energía del metabolismo anaerobio, desde un punto de vista cuantitativo, a la respuesta de escape, no fue evidente en el presente estudio, ya que en músculo la disminución de la concentración de glucógeno así como el aumento de la concentración de lactato no fueron estadísticamente diferentes: El aumento en la concentración de lactato en la hemolinfa probablemente refleja la producción de lactato en el músculo. Otros estudios han reportado resultados similares; es decir únicamente un aumento de lactato en hemolinfa, sin cambios en la concentración de lactato en el músculo ante una situación de actividad intensa y trabajo muscular, lo cual se atribuyó a la difusión del lactato del músculo a la hemolinfa (Yu et al., 2009, Aparicio-Simón et al., 2010). En contraste, y dependiendo de la naturaleza de la actividad física, en *O. limosus*, la concentración de lactato en el músculo aumentó hasta 5 veces, mientras que no se observaron cambios en la concentración de lactato en la hemolinfa justo después de la actividad física (Gäde, 1984). En el caso de *C. crangon*, la concentración de lactato aumentó dos veces tanto en músculo como en hemolinfa (Onnen y Zebe, 1983), mientras que en *C. destructor* el contenido de lactato en el músculo aumentó 10 veces, aunque los niveles en la hemolinfa no se reportaron.

Con base en la concentración molar del ATP, el abastecimiento de energía en forma de ATP puede ser calculado cuantitativamente durante la actividad intensa por 25 s. La disminución del ATP representa  $2.4 \mu\text{moles g}^{-1}$  que no fueron “repuestos” de otra fuente metabólica, mientras que la hidrólisis equimolar de ArgP da lugar a la producción de otros  $5.3 \mu\text{moles g}^{-1}$ . Considerando  $3 \mu\text{moles g}^{-1}$  de ATP por cada unidad glucosil obtenida del glucógeno en músculo, y aunque la disminución de glucógeno no fue significativa, la contribución calculada del metabolismo anaerobio fue de  $25.1 \mu\text{moles g}^{-1}$ .

Por lo tanto, asumiendo que el metabolismo aerobio no fue activado a niveles significativos dentro de este corto periodo de tiempo (25 s), el gasto teórico total de energía de la respuesta de escape fue de  $32.8 \mu\text{moles de ATP g}^{-1}$  en base húmeda. Lo anterior es menor (48.1) a lo reportado para *C. destructor* (England y Baldwin, 1983), pero mayor (11.6 a 18.6) a lo reportado para *O. limosus* (Gäde, 1984). Con lo anterior, la contribución calculada del metabolismo anaerobio al gasto energético fue de 76%, lo

cual es considerablemente mayor a lo reportado en estudios previos: 9 a 46% en *O. limosus*, dependiendo de la frecuencia y duración de la actividad (Gäde, 1984), y 49.3% en *C. destructor* (England y Baldwin, 1983).

### **8.2.3 Recuperación del estado energético**

El restablecimiento de la concentración del ATP y la conservación de la CEA después del incremento pronunciado del gasto energético que ocurrió en la respuesta de escape es esencial para la actividad posterior y para mantener la homeostasis celular. Una disminución drástica de la CEA resulta de la alteración en la concentración individual de nucleótidos, lo cual puede afectar el flujo metabólico general. En el presente estudio las concentraciones de ATP, CEA y ArgP regresaron a los niveles encontrados en organismos en reposo (control) una hora después de la respuesta de escape. Aunque si bien en el presente estudio no se siguió el curso temporal de los niveles de los nucleótidos y ArgP, en *C. crangon* el ATP y la CEA se restablecieron por completo después de 5 min de haber realizado la actividad física, mientras que las concentraciones basales de ArgP se alcanzaron al cabo de una hora (Onnen y Zebe, 1983). En contraste, en la trucha arcoiris, el restablecimiento la concentración del fosfágeno (creatinin fosfato) ocurrió antes que aquella del ATP (Wang et al., 1994).

La concentración de lactato en plasma se mantuvo por arriba del valor encontrado en los organismos control, hasta una hora después de la manipulación por transferencia y persecución en *L. vannamei* (Aparicio-Simón et al., 2010), y hasta tres horas después de la actividad física en *C. crangon* (Onnen y Zebe, 1983). Aunque en el presente estudio la concentración de glucosa en plasma no aumentó inmediatamente después de la actividad física intensa, el incremento de la concentración glucosa se observó después de una hora de recuperación, coincidiendo con el curso temporal de la glucosa en plasma después de la manipulación de *L. vannamei* por 1 min (Aparicio-Simón et al., 2010). Lo anterior sugiere que en la respuesta de estrés en el camarón, el pico de la concentración de glucosa se alcanza una hora después del estímulo.

Los resultados sugieren que la movilización de la glucosa al plasma, que ocurre solo al cabo de dos horas de recuperación, se relaciona principalmente a la reposición de los niveles tanto de ATP como de ArgP más que a su utilización directa de este combustible durante las contracciones repetidas para producir el ATP utilizado durante la contracción muscular por sí misma. Otras reservas como lípidos y proteínas

aparentemente no estuvieron involucradas en la recuperación del estado energético ya que no se observaron cambios en dichos componentes en ningún tejido, lo que concuerda con estudios previos (Yu et al., 2009; Aparicio-Simón et al., 2010). Se ha observado en otros estudios que diferentes protocolos que inducen estrés, pueden dar lugar a un aumento en la utilización de lípidos y proteínas para satisfacer la demanda energética (Racotta y Palacios, 1998).

El metabolismo de los nucleótidos durante la respuesta de escape y durante la subsecuente recuperación en decápodos crustáceos sólo se ha analizado en músculo (England y Baldwin, 1983; Onnen y Zebe, 1983; Gäde, 1984). En otras condiciones que comprometen la entrega o producción de energía, como hipoxia (Abe et al., 2007) o ayuno (Dickson y Giesy, 1981), la CEA en el hepatopáncreas fue menor y con una diferencia cuantitativamente mayor que en el músculo. El nivel de la CEA en el hepatopáncreas del camarón kuruma *Marsupenaeus japonicus*, disminuyó de 0.7 a 0.5 durante un periodo de hipoxia de 6 h, mientras que la disminución en el músculo no fue significativa y sólo fue de 0.97 a 0.84 (Abe et al., 2007). En el caso de *Procambarus clarkii*, la CEA aumentó en el músculo, mientras que en el hepatopáncreas disminuyó por debajo de 0.75, después de 21 días de ayuno. En contraste, en el presente estudio, los niveles de ATP y CEA en el hepatopáncreas no fueron afectados en el estado de agotamiento físico e incluso aumentaron durante la recuperación. Este efecto probablemente está relacionado con el papel del hepatopáncreas en la restauración de la energía y la homeostasis de la glucosa, análogo al ciclo de Cori de vertebrados, posiblemente hubo un incremento en la producción de ATP a partir de diferentes sustratos metabólicos para compensar la alta demanda de energía por la gluconeogénesis post-ejercicio. Lo anterior concuerda con las elevadas tasas de remoción de lactato de la hemolinfa, como fue sugerido previamente (Aparicio-Simón et al., 2010).

#### **8.2.4 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo después de periodos intensos de contracción muscular es una respuesta conservada en la mayoría de las especies (Nikolaidis et al., 2012), aunque el fenómeno no ha sido estudiado en crustáceos. El aumento en la producción de las especies reactivas de O<sub>2</sub> (ERO) durante la respuesta de escape puede resultar

principalmente del aumento en la tasa metabólica y la temperatura, ambas condiciones producidas durante la contracción muscular intensa.

Las fuentes más importantes de ERO identificadas en el músculo esquelético durante la actividad física intensa son NADH (P) oxidasa (NOX), la fosforilación oxidativa, xantina oxidasa y las lipoxigenasas (Bedard y Krause, 2007; Ferreira y Reid, 2007; Allen et al., 2008; Powers y Jackson, 2008), aunque las últimas dos fuentes son mencionadas en la literatura como menos relevantes que las demás, desde un punto de vista cuantitativo. Como se discutió previamente, la respuesta de escape es sostenida energéticamente principalmente por la glucólisis. La producción de  $O_2^{\bullet-}$  a través de NOX durante una alta actividad glucolítica, ha sido reconocida recientemente como un mecanismo para contrarrestar la conversión de  $NAD^+$  a partir de NADH que se encuentra limitada durante la glucólisis anaerobia por la actividad de la lactato deshidrogenasa (Lu et al., 2012). El  $O_2^{\bullet-}$  es rápidamente convertido a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la SOD, el cual a su vez puede ser metabolizado posteriormente a  $H_2O$  por CAT, GPx y por las peroxirredoxinas, de esta manera se evita la formación de otras ERO y un posible daño causado por la interacción con lípidos, proteínas y otros componentes celulares (Lesser et al., 2006; Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009).

En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en la tasa de producción endógena de  $O_2^{\bullet-}$  no se vio modificada. Halliwell y Gutteridge (2007) señalaron que la única evidencia de la ocurrencia de estrés oxidativo *in vivo* es el incremento de los sistemas de defensa antioxidantes, ya que lo anterior indica que el sistema ha respondido. Las enzimas antioxidantes no son meros depósitos pasivos de oxidantes intracelulares, más bien son sensores y efectores de rutas redox-reguladas (Halliwell y Gutteridge, 2007). Por lo tanto, el aumento de la actividad de GPx en el músculo de los camarones agotados sugiere que hubo un incremento de la concentración de  $H_2O_2$ . Aunque no existen estudios que analicen el estrés oxidativo en relación a la actividad física de camarones peneidos, el aumento de la actividad de GPx en crustáceos se ha encontrado en otras condiciones adversas, como la hipoxia seguida por un periodo de reoxigenación (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011) o por la exposición a saponina como un tratamiento de protección en contra de *Vibrio alginolyticus* (Su y Chen, 2008). En contraste, la actividad de GPx, así como otras enzimas antioxidantes, disminuyó en el músculo abdominal en respuesta a la infección



por el virus de la mancha blanca (WSSV por sus siglas en inglés white spot syndrome virus) (Parrilla-Taylor et al., 2013). El  $H_2O_2$  además de ser removido, por GPx, es removido por otras enzimas como CAT y tiorredoxina (TRX), las cuales tienen distinta localización celular, y diferente afinidad al  $H_2O_2$ , y por tanto estas enzimas tienen una función particular en la ruta coordinada de metabolismo del  $H_2O_2$ . A elevadas concentraciones de  $H_2O_2$ , TRX es inactiva, mientras que CAT y GPx siguen activas, GPx puede incluso actuar sobre hidroxiperóxidos orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 2007; Messens et al., 2013). Lo anterior ha sido recientemente analizado en crustáceos, en un estudio realizado en el camarón *Fenneropenaeus chinensis* donde se analizó la expresión y actividad de las tres enzimas antes mencionadas, después de haber inyectado  $H_2O_2$  en el cefalotórax de los organismos, y se observó que la actividad y la expresión génica de CAT y GPx aumentó, mientras que no se observó ningún efecto para la tiorredoxin peroxidasa (Wang et al., 2012). Tal como sucede en los vertebrados, la actividad enzimática así como la expresión génica de CAT en músculo abdominal de camarones peneidos es menor o por debajo del límite de detección en comparación con otros tejidos. En el presente estudio la actividad de CAT estuvo por debajo del límite de detección en el músculo abdominal, en el hepatopáncreas no se observó efecto en la actividad de CAT por la respuesta de escape.

Durante la recuperación de la actividad física intensa, el metabolismo del organismo es dirigido al restablecimiento de la homeostasis alterada, con energía producida tanto del metabolismo glucolítico como el oxidativo (Gäde, 1984; Thibodeaux et al., 2009; Aparicio-Simón et al., 2010). Este incremento del metabolismo sugiere una situación general de estrés oxidativo que puede durar horas o incluso días, dependiendo de la naturaleza de la actividad física (Nikolaidis et al., 2012). De acuerdo con lo anterior, la actividad de GPx fue mayor con respecto a los organismos en reposo, una hora después de estímulo inicial. Se sugiere que dicha respuesta antioxidante fue suficiente para prevenir el daño oxidativo en el músculo o hepatopáncreas de *L. vannamei*, con base en los niveles de TBARS y carbonilos proteicos, ya que no se observaron diferencias significativas en dichos indicadores durante la respuesta de escape ni durante la recuperación. La respuesta de escape es parte del comportamiento natural del camarón, por lo que se espera que éste tenga mecanismos que compensen un incremento de las ERO. Algo similar se discutió para la capacidad de eliminación del lactato producido

por el músculo (Aparicio-Simón et al., 2010). De forma similar, en otras situaciones consideradas “normales” para el camarón, tal como una situación de hipoxia seguida por un periodo de reoxigenación, no se observó un aumento en los niveles de TBARS (Zenteno-Savín et al., 2006), mientras que en camarones infectados con WSSV se encontró un incremento significativo en los niveles de TBARS y carbonilos proteicos en *L. vannamei* (Parrilla-Taylor et al., 2013).

La producción de ERO durante contracciones musculares sostenidas y repetitivas tienen un papel en la fatiga, en vertebrados (Allen et al., 2008, Jackson et al., 2009; Dutka et al., 2011 Lamb y Westerblad, 2011). Se ha sugerido que los procesos que pueden ser responsables de la fatiga están relacionados al manejo del  $\text{Ca}^{+2}$  por parte de las células musculares y a los cambios en la sensibilidad al  $\text{Ca}^{+2}$  de distintos efectores celulares (Jackson et al., 2008; Finkel 2011).

Un ligero incremento de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  da lugar al aumento de la fuerza durante la contracción muscular, pero existe un umbral de concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que de ser rebasado produce un efecto contrario y la fuerza muscular se pierde o disminuye (Reid et al., 1993; Nikolaidis et al., 2012). Lo anterior se ha asociado a la oxidación por  $\text{H}_2\text{O}_2$  o  $\text{OH}^\bullet$  (el último producido durante la reacción de Fenton) de grupos sulfhidrilo en residuos cisteína de proteínas involucradas en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  y la contracción muscular, tal como la ATPasa, SERCA (por sus siglas en inglés sarco edoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{+2}$  ATPase) y RyR (por sus siglas en inglés ryanodine receptors) (Lamb y Westerblad, 2011). Aunque el glutatión (GSH) es reconocido como el principal agente en el mecanismo que previene la oxidación antes mencionada, la GPx puede tener un papel importante por su acción sobre  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo y a pesar de que el balance de GSH/GSSG no se cuantificó en el presente estudio, la actividad de la GPx puede alterar la proporción de GSH/GSSG (debido al uso de GSH en su catálisis) y puede afectar el estado redox de las células (Schafer y Buettner, 2001). Por tanto el aumento de la actividad de GPx puede ser interpretado como un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo durante la respuesta de escape del camarón, pero al mismo tiempo lo anterior disminuiría la capacidad detoxificadora en contra de  $\text{OH}^\bullet$ , por GSH, lo cual podría explicar la fatiga. Se necesitan estudios posteriores para entender mejor la contribución particular de las ERO (como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{OH}^\bullet$ ) así como la interacción de GPx

y GSH en la fatiga después la repetición de una serie de flexiones abdominales en crustáceos decápodos.

Durante los periodos intensos de actividad física, el estrés oxidativo no se presenta sólo a nivel del músculo, sino que incluso se presenta en otros tejidos como el hígado, células de la sangre, cerebro, riñones (Nikolaidis et al., 2012). En el presente estudio se esperaba que el hepatopáncreas pudiera tener un papel importante durante el periodo de recuperación, por su función en procesos como la eliminación del lactato, lo cual aumentaría el metabolismo de este tejido, y por tanto, la producción de ERO. Sin embargo, ninguno de los indicadores analizados sugieren tal efecto, por lo que se puede asumir que la producción de ERO no aumentó o que los niveles de actividad enzimática antioxidante basal o de los antioxidantes endógenos fueron suficientes para contrarrestar los efectos de un incremento en la producción de las ERO. Lo anterior puede ser debido a una mayor capacidad antioxidante del hepatopáncreas en comparación con otros tejidos, particularmente el músculo. La actividad basal de CAT y GPx son menores, mientras que la actividad de la SOD se reportó como mayor o ligeramente menor, en el músculo que en el hepatopáncreas (Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Parrilla-Taylor et al., 2013). Aunque el músculo no se analizó en el estudio de Trasviña-Arenas et al. (2013), se reportó que la expresión del gen de CAT fue casi 20 veces mayor, aunque su actividad fue ligeramente mayor, en el hepatopáncreas que en las branquias. Un patrón similar de mayor expresión génica pero actividad enzimática comparable se observó para SOD en hepatopáncreas y branquias (García-Triana et al., 2010a), mientras que tanto la expresión génica como la actividad peroxidasa fue mayor en hepatopáncreas que en las branquias (García-Triana et al., 2010b).

### **8.3 Evaluación del consumo de O<sub>2</sub> posterior a la respuesta de escape**

Debido a que los antecedentes sugerían cierto papel del metabolismo oxidativo durante la recuperación a la respuesta de escape, se evaluó el MO<sub>2</sub> sólo durante la etapa de recuperación. Además, por la naturaleza misma de esta respuesta de corta duración, no era posible evaluar el MO<sub>2</sub> durante la respuesta como tal.

El MO<sub>2</sub> analizado en este estudio representa la tasa metabólica de rutina, ya que los organismos se encontraban en ayuno y podían realizar actividad física espontánea dentro del respirómetro (Hochachka y Somero, 2002). El valor de la tasa metabólica de

rutina en la primera hora en el control sin transferencia es similar al promedio reportado por Carvalho y Phan (1997),  $0.39 \text{ mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , para peneidos marinos.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que tanto en una condición normal (control) o de estrés (respuesta de escape hasta agotamiento) no hubo un efecto en el  $\text{MO}_2$  por la transferencia de los camarones de un tanque al respirómetro entre 1 y 6 horas después de dicha transferencia. Lo anterior sugiere que el posible estrés inherente a la transferencia (manipulación para tomar al organismo, breve exposición aérea, ligero cambio de temperatura) no provocó una demanda de energía adicional o bien que esta demanda fue cubierta o superada al cabo de unos minutos (antes de 1 h). Alternativamente, hubo un aumento de  $\text{MO}_2$  por efecto de la transferencia antes de la primer hora a la cual se tiene el primer registro de oxígeno disuelto. En caso de haber ocurrido dicho aumento de  $\text{MO}_2$ , probablemente fue poco marcado y de corta duración, dado que no se reflejó en el  $\text{MO}_2$  integrado registrado durante la primera hora. En trabajos previos, se ha reportado que el efecto de la transferencia es superado entre una y dos horas en distintas especies de camarones como *L. vannamei* (Bett y Venatea, 2009); *Xiphopenaeus kroyeri* (Carvalho y Phan, 1997) y *L. stylirostris* (Spanopoulos-Hernández et al., 2005) en condiciones en las cuales los organismos no tuvieron otra condición o estrés. De manera similar, Martínez-Palacios et al. (1996) concluyeron que el  $\text{MO}_2$  en *L. vannamei* se estabiliza a las 4 h, principalmente entre la primera y segunda hora, periodo durante el cual la disminución del  $\text{MO}_2$  fue de aproximadamente 50%; si bien en el presente trabajo se observó diferencia entre grupos transferidos en ese momento y los aclimatados un día antes, si se observó una disminución significativa a lo largo de 6 horas transcurridas en el respirómetro para todos los grupos, aspecto que se discutirá más adelante. El hecho que la transferencia no tenga como efecto aparente un aumento de  $\text{MO}_2$  o que éste haya sido superado al cabo de una hora puede deberse a que la transferencia se realizó de una forma adecuada, de tal manera que no representó un estrés para los organismos. En este sentido, las precauciones que se tomaron fueron las siguientes; i) asegurarse que la diferencia en la temperatura entre el tanque y el respirómetro no fuera mayor a  $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ , ii) realizar la transferencia de forma rápida, inmovilizando al camarón de forma manual para que este no realizara flexiones del abdomen durante la transferencia, entre otros.

La disminución del  $MO_2$  a lo largo de las 6 horas puede deberse a dos razones. En primer lugar, existe la posibilidad de haber alcanzado el punto crítico en el cual el metabolismo se vuelve dependiente del OD (Bridges y Brand, 1980) que fue disminuyendo en el tiempo de 6 a 3  $mg L^{-1}$ , aunque se descartaron los datos en los cuales el porcentaje de saturación del agua fuese menor al 50% de saturación de OD. Sin embargo, es difícil definir el punto crítico dado que varía entre experimentos dependiendo de las condiciones experimentales particulares, el tamaño y la especie (Racotta et al., 2002), por lo cual no se puede decir con certeza que éste haya sido el caso. La otra posibilidad es que si bien el efecto de la transferencia no fue claro en las condiciones del presente experimento, si hubo cierto estrés inicial aún en el grupo control absoluto (sin transferencia ni respuesta de escape) por la presencia misma de la persona y de la introducción del electrodo en el respirómetro lo cual aumentó el  $MO_2$ , mismo que se estabilizó a lo largo de las 6 horas, periodo en el cual se hubiese alcanzado realmente el nivel de metabolismo basal. La variación del consumo de oxígeno en relación al tiempo transcurrido en respirómetros se tiene documentada en varios trabajos previos. Al analizar la tasa de consumo por cuatro horas de *L. vannamei* recién transferidos al respirómetro, Bett y Venatea (2009) no encontraron diferencias significativas en el  $MO_2$ , aunque se encontró cierta disminución del 20% a la hora 4 con respecto a la hora 1. En *L. stylirostris*, Spanopoulos-Hernández et al. (2005) encontraron que el  $MO_2$  disminuyó significativamente a las dos horas y se mantuvo hasta las 4 h, con un valor 48% menor que en la primera hora. En *X. kroyeri* Carvalho y Phan (1997) al realizar el seguimiento del  $MO_2$  por 24 horas después de haber transferido a los organismos a los respirómetros, no encontraron cambios, pero encontraron que el  $MO_2$  cambia significativamente por la exposición a condiciones de luz u oscuridad, el mayor cambio se registró entre el mediodía y la noche, aumentando 22% en la noche.

El restablecimiento del  $MO_2$  ocurrió después de dos horas posteriores a la inducción de la respuesta de escape hasta el agotamiento. La langosta de agua dulce *C. destructor* (6-8 g) se recuperó a los 38 min después de un número similar de flexiones del abdomen (30), y este menor tiempo puede estar asociado a la temperatura a la cual se realizó el experimento (20°C) o al menor tamaño de los organismos (Head y Baldwin, 1986). *Sagmariasus verreauxi* (314-513 g) estimulados por 5 min se recuperaron al cabo de

10.20 horas (Jensen et al., 2013), *Cancer magister* (850 g) después de 20 min de estimulación se recuperó a las dos horas en las que el  $MO_2$  aumentó 4 veces con respecto al  $MO_2$  en reposo (McMahon, 1979), *Gecarcoidea natalis* (80-200 g) después de caminar por 5 min el  $MO_2$  aumentó 2.2 veces y se mantuvo hasta los 45 min (Adamczewska y Morris, 1994).

El suministro de energía durante la respuesta de escape es principalmente anaerobio; se genera una deuda de  $O_2$  que es compensada en la fase de recuperación por un aumento en el  $MO_2$ . Esta deuda de  $O_2$  durante la recuperación por actividad física ha sido reportada para otros crustáceos, en donde el  $O_2$  consumido puede ser utilizado para 1) metabolizar los productos del metabolismo anaerobio, 2) restablecer los niveles de  $O_2$  en los tejidos, 3) restablecer las reservas de los fosfatos de alta energía, 4) satisfacer el costo energético asociado con el aumento en la ventilación en la cámara branquial y la circulación de la hemolinfa (Herreid, 1980). Por lo antes mencionado se esperaba que el restablecimiento del  $MO_2$  fuera menor a lo reportado para *C. destructor* (Head y Baldwin, 1986), en el cual se reportó un aumento en la concentración de lactato en el músculo de 9 veces en organismos exhaustos (England y Baldwin, 1983). En el presente estudio y en otro trabajo previo en *L. vannamei* (Yu et al., 2009), la concentración del lactato en músculo no aumentó, lo que sugiere una menor aportación del metabolismo anaerobio a la respuesta de escape, lo que supondría una menor demanda de  $O_2$  durante la recuperación. Sin embargo, los otros usos sugeridos para el  $O_2$  durante la recuperación podrían explicar la necesidad de un mayor tiempo para el restablecimiento del  $MO_2$  en *L. vannamei*. Otra posibilidad es una menor aportación del metabolismo anaerobio durante la recuperación en *L. vannamei* en comparación a otros decápodos como *C. crangon* en el que se reportó que después de una situación de estrés la concentración del lactato en la hemolinfa disminuyó entre las tres y diez horas (Onnen y Zebe, 1983) mientras que en *L. vannamei* se reportó la disminución entre las dos y cuatro horas (Aparicio-Simón et al., 2010).

## 9. CONCLUSIONES

Para analizar la CEA en *L. vannamei*, se recomienda que los camarones sean congelados con nitrógeno líquido y almacenados a  $-76^{\circ}\text{C}$  hasta por dos años, o disectados en fresco e inmediatamente homogenizados en ácido.

La homogenización de tejido en el molino mezclador criogénico es la más recomendable en términos de los valores fisiológicos reales de CEA y menor coeficiente de variación.

Se obtuvieron valores mayores de CEA y ArgP de organismos recién transferidos de estanques, éstos se pueden variar y disminuir después de un mes de mantenimiento en condiciones subóptimas (e.g. alta densidad) y pueden restablecerse al transferir a los organismos a condiciones óptimas (e.g. baja densidad).

Es factible extraer hemolinfa y utilizar a los mismos organismos para analizar la CEA y la concentración de ArgP si los organismos son anestesiados y/o si el organismo es seccionado en el primer segmento abdominal.

La alta demanda energética durante la respuesta de escape hasta agotamiento en *L. vannamei* aparentemente es compensada por la glucólisis del músculo, lo que permite mantener cierta homeostasis energética celular en términos de la CEA después del consumo de ArgP.

Al cabo de una hora de recuperación la CEA y la concentración de ArgP son restablecidas, mientras que el consumo de oxígeno se restablece después de dos horas.

La repuesta de escape induce la activación del sistema antioxidante enzimático del músculo, lo cual sugiere que la posible producción de especies reactivas de oxígeno asociada al aumento en el consumo de oxígeno es neutralizada para prevenir un posible daño oxidativo, dado que no se observó un aumento en los indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas.

## 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 Physiol A*. 146, 40–46.
- Aebi, H., P. Lester. 1984. Catalase in vitro, *Method Enzymol*, 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. *Aquacult Nutr* 18 258-271.
- 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.
- Albalat, A., S.G. Gornik, W. Muellen, A. Crozie, R.J. Atkinson, G.A. Coombs, D.M. Neil. 2011. Quality changes in chilled Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) tail meat and the effects of delayed icing. *Int J Food Sci Tech*. 46:1413-1421.
- Allen, D.G., G.D. Lamb, H. Westerblad. 2008. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev*. 88:287-332.
- Allen, D.G., S. Trajanovska. 2012. The multiple roles of phosphate in muscle fatigue. *Front Physiol*. 3:463.
- Angela, M. I., 1980. The adenylate energy charge in the estuarine mollusc, *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Comp Biochem Physiol A* 66, 43-55.
- Aniagu, S.O., N. Day, J.K. Chipman, E.W. Taylor, P.J Butler, M.J. Winter. 2006. Does exhaustive exercise result in oxidative stress and associated DNA damage in the chub (*Leuciscus cephalus*)?. *Environ Mol Mutagen*. 47:616-623.
- Aparicio-Simón, B., 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.
- Arnott, S.A., D.M. Neil, A.D. Ansell. 1998. Tail-flip mechanism and size-dependent kinematics of escape swimming in the brown shrimp *Crangon crangon*. *J Exp Biol* 201:1771-1784.
- Arnott, S.A., D.M. Neil, A.D. Ansell. 1999. Escape trajectories of the brown shrimp *Crangon crangon*, and a theoretical consideration of initial escape angles from predators. *J Exp Biol*. 202:193-209.
- Atkinson, D.E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7:4030–4034.
- Atkinson, D.E., G.M. Walton. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *J Biol Chem*. 242:3239–3241.
- Baldwin, J., A. Gupta, X.Iglesias. 1999. Scaling of anaerobic energy metabolism during tail flipping behaviour in the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Mar Freshwater Res* 50, 183-187.
- Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12 103-118.



- Barshaw, D.E., K.L. Lavalli, E. Spanier. 2003. Offense versus defense: responses of three morphological types of lobsters to predation. *Mar Ecol-Prog Ser.* 256:171-182.
- Bedard, K., K.H. Krause. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87:245-313.
- Bergman, D.A., P.A. Moore. 2003. Field observations of intraspecific agonistic behavior of two crayfish species, *Orconectes rusticus* and *Orconectes virilis*, in different habitats. *Biol Bull.* 205, 26-35.
- Bett, C., L. Vinatea. 2009. Combined effect of body weight, temperature and salinity on shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. *B J O.* 57 305-314.
- 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., A.R. Brand. 1980. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of some marine crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.,* 65A, 399-409.
- Brookes, P.S., Y.Yoon, J.L. Robotham, M.W. Anders, S.-S. Sheu. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol-Cell Ph* 287, C817-C833.
- Cairns, S.P. 2013. Holistic approaches to understanding mechanisms of fatigue in high-intensity sport. *Fatigue: Biomed Health Behav.* 1, 148-167.
- Cairns, S.P., M.I Lindinger. 2008. Do multiple ionic interactions contribute to skeletal muscle fatigue? *J Physiol.* 586, 4039-4054.
- Carlsson, K.-H., G. Gäde. 1986. Metabolic adaptation of the horseshoe crab, *limulus polyphemus*, during exercise and environmental hypoxia and subsequent recovery. *Biol Bull* 171, 217-235.
- Carvalho, P.S.M., V.N. Phan. 1997. Oxygen consumption and ammonia excretion of *Xiphopenaeus kroyeri* Heller (Penaeidae) in relation to mass temperature and experimental procedures Shrimp oxygen uptake and ammonia excretion. *J Exp Mar Biol Ecol.* 209, 143-156.
- Chen, J.-C., S.-Y. Cheng. 1995. Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite. *Aquat. Toxicol.* 33, 215-226.
- Cho, J. S., T. H. Kim, J.-M. Lim, J.-H. Song. 2008. Effects of eugenol on Na<sup>+</sup>-currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 1243 53-62.
- Cochemé, H.M., C. Quin, S. McQuaker, F. Cabreiro, A. Logan, T. Prime, I. Abakumova, J.V. Patel, I.M. Fearnley, A.M. James, C.M. Porteous, R.A.J. Smith, A. Saeed, J.E. Carré, M. Singer, D. Gems, R.C. Hartley, L. Partridge, M. P. Murphy. 2011. Measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab.* 13:340-350.
- Cooke, M., M. Iosia, T. Buford, B. Shelmadine, G. Hudson, C. Kerksick, C. Rasmussen, M. Greenwood, B. Leutholtz, D. Willoughby, R. Kreider. 2008. Effects of acute and 14-day coenzyme Q10 supplementation on exercise performance in both trained and untrained individuals. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 5,8.

- Coyle, S.D., S. Dasgupta, H. J. Tidwell, T. Beavers, L.A. Bright, D. K. Yasharian. 2005. Comparative Efficacy of Anesthetics for the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. J World Aquacult Soc. 36 282-290.
- Cromarty, S.I., J. Mello, G. Kass-Simon. 2000. Molt-Related and Size-Dependent Differences in the Escape Response and Post-Threat Behavior of the American Lobster, *Homarus americanus*. Bio Bull 199, 265-277.
- Cuevas, M.J., M. Almar, J.C. García-Glez, D. García-López, J.A. De Paz, I. Alvear-Órdenes, J. Gonzáles-Gallego. 2005. Changes in oxidative stress markers and NF-kB activation induced by sprint exercise. Free Radic. Res. 39, 431-439.
- Daniel, T.L., E. Meyhöfer. 1989. Size limits in escape locomotion of caridean shrimp. J. Exp. Biol. 143, 245-265.
- Debold, E. 2012. Recent insights into muscle fatigue at the cross-bridge level. Front. Physiol. 3, 151.
- Dehn, P.F., K. Haya, D.E. Aiken. 1985. Adenylate energy charge, arginine phosphate and atpase activity in juvenile *homarus americanus* during the molt cycle. Comp Biochem Phys B 81, 629-633.
- Dickson, G.W., J.P. Giesy. 1982a. Seasonal variation of phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in dorsal tail muscle of the crayfish, *Procambarus acutus acutus* (decapoda: astacidae). Comp. Biochem. Physiol. A 72, 295-299.
- Dickson, G.W., J.P. Giesy. 1982b. The effects of starvation on muscle phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge of surface and cave crayfish. Comp. Biochem. Physiol. A 71, 357-361.
- 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.
- Drossos, G., A. Lazou, P. Panagopoulos, S. Westaby. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. Ann. Thorac. Surg. 59, 169-172.
- Dutka, T.L., J.P. Mollica, G.S. Posterino, G.D. Lamb. 2011. Modulation of contractile apparatus  $Ca^{2+}$  sensitivity and disruption of excitation-contraction coupling by S-nitrosoglutathione in rat muscle fibres. J. Physiol. 589:2181-2196.
- Edwards, D.H., W.J. Heitler, F.B. Krasne. 1999. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. Trends Neurosci. 22:153-161.
- Ellington, W.R. 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. Annu Rev Psychol. 63, 289-325.
- England, W.R., J. Baldwin. 1983. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): Role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. Physiol. Zool. 56:614-622.
- Faulkes, Z. 2008. Turning loss into opportunity: The key deletion of an escape circuit in decapod crustaceans. Brain Behav. Evol. 72:251-261.
- Ferreira, L.F., M.B. Reid. 2008. Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. J. Appl. Physiol. 104:853-860.

- Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194, 7-15.
- Fisher-Wellman, K., Bloomer, R. 2009. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med.* 8, 1.
- Flohé, L., W. Günzler. 1984. Assays of glutathione peroxidase. In: Packer, L. (Ed) *Oxygen radicals in biological systems*, vol. 105. *Methods in enzymology*, Elsevier, pp.114-121.
- Fridovich, I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 23:239-257.
- Gäde, G. 1981. Energy Production during Swimming in the Adductor Muscle of the Bivalve *Lima hians*: Comparison with the Data from Other Bivalve Mollusks. *Physiol Zool.* 54, 400-406.
- Gäde, G. 1983. Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J Exp Zool* 228:415-429.
- Gäde, G. 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Comp Biochem Physiol A.* 77:495-502.
- García-Triana, A., T. Zenteno-Savín, A.B. Peregrino-Uriarte, G.Yepiz-Plascencia. 2010a. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: Effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Dev Comp Immunol.* 34:1230-1235.
- García-Triana, A., S. Gámez-Jiménez, A.B. Peregrino-Uriarte, A. López-Zavala, G., González-Aguilar, R. R. Sotelo-Mundo, E.M. Valenzuela-Soto, G. Yepiz-Plascencia. 2010b. Expression and silencing of Selenoprotein M (SelM) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Effect on peroxidase activity and hydrogen peroxide concentration in gills and hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol A.* 155:200-204.
- Georlette, D., V. Blaise, T. Collins, S. D'Amico, E. Gratia, A. Hoyoux, J.-C. Marx, G. Sonan, G. Feller, C. Gerday. 2004. Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiol Rev.* 28:25-42.
- Giesy, J.P., S.R. Denzer, C.S. Duke, G.W. Dickson. 1981. Phosphoadenylate concentrations and energy charge in two freshwater crustaceans: Responses to physical and chemical stressors. *Verh Internat Verein Limnol.* 21:205-220.
- Giesy, J.P. 1998. Phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge of largemouth bass (*Micropterus salmoides*): relationship with condition factor and blood cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A 367-377.
- Gornik, S.G., A. Albalat, R.J. Atkinson, G.A. 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.
- Gornik, S.G., A. Albalat, R.J.A. Atkinson, G.H. Coombs, D.M. Neil. 2008. The time course of early post-mortem biochemical processes in the abdominal muscle of a commercially important decapod crustacean *Nephrops norvegicus*: Implications for post-catch processing. *Mar Freshw Behav Physiol.* 41:241-256.

- Groussard, C., F. Rannou-Bekono, G. Machefer, M. Chevanne, S. Vincent, O. Sergent, J. Cillard, A. Gratas-Delamarche. 2003. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 89:14-20.
- Hall, M.R., E.H. van Ham. 1998. The effects of different types of stress on blood Glucose in the Giant Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *J World Acuaq Soc.* 29:290-299.
- Halliwell, B., J. Gutteridge. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford University Press, Oxford.
- Harris, R.R., M.C.F. Santos. 2000. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). *Mar Biol.* 137:691–703.
- Head, G., Baldwin, J. 1986. Energy metabolism and the fate of lactate during recovery from exercise in the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* *Mar Freshwater Res.* 37, 641-646.
- Herberholz, J., M.M. Sen, D.H. Edwards. 2004. Escape behavior and escape circuit activation in juvenile crayfish during prey-predator interactions. *J Exp Biol.* 207:1855-1863.
- Hermes-Lima, M., T. Zenteno-Savín. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Phys C.* 133 537-556.
- Herreid, C.F. 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comp Biochem Physiol A.* 67,311–320.
- Hochachka, P.W., G. N. Somero. 2002. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press. New York. 466p.
- Holman, J.D., Hand, S.C. 2009. Metabolic depression is delayed and mitochondrial impairment averted during prolonged anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935). *J Exp Mar Biol Ecol.* 376, 85-93.
- Ishioka, H., O. Fukuhara, S. Sakaguchi. 1974. Studies on the anesthetic effects of eugenol to Kuruma prawn juveniles. *Bull Nansei Reg Fish Res Lab.* 7 31–42.
- Ivanovici, A.M. 1980a. Application of adenylate energy charge to problems of environmental impact assessment in aquatic organisms. *Helgoland Mar Res* 33:556–565.
- Ivanovici, A.M. 1980b. The adenylate energy charge in the estuarine mollusc, *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Comp Biochem Physiol A.* 66:43–55.
- Jackson, M.J. 2008. Redox regulation of skeletal muscle. *IUBMB Life.* 60:497-501.
- Jackson, M.J. 2009. Redox regulation of adaptive responses in skeletal muscle to contractile activity. *Free Radic Biol Med.* 47:1267-1275.
- Joseph, A., R. Philip. 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture.* 272 87-97.
- Koyama, H., D.B. Akolkar, S. Piyapattanakorn, S. Watabe. 2012a. Cloning, expression, and localization of two types of fast skeletal myosin heavy chain genes from black tiger and pacific white shrimps. *J Exp Zool A.* 317:608-621.

- Koyama, H., D.B. Akolkar, T. Shiokai, M. Nakaya, S. Piyapattanakorn, S. Watabe. 2012b. The occurrence of two types of fast skeletal myosin heavy chains from abdominal muscle of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* and their different tissue distribution. *J Exp Biol.* 215:14-21.
- Lamb, G.D., H. Westerblad. 2011. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. *J Physiol.* 589:2119-2127.
- Lazou, A. 1989. Adenylate metabolizing enzymes in invertebrate tissues. *Comp Biochem Physiol B.* 92:175-180.
- Le Coz, R. 1989. La charge energetique adenylique: mise au point application a trois mollusques bivalves, synthese et perspectives. Documento no publicado.
- Le Moullac, G., M. Cheize, O. Gastineau, J.Y. Daniel, J.R. Le Coz, A. Huvet, J. Moal, S. Pouvreau, A. Van Wormhoudt, J.F. Samain. 2008. Ecophysiological and metabolic adaptations to sulphide exposure of the oyster *Crassostrea gigas*. *J Shellfish Res.* 27:355-363.
- Lehninger, A.L. 1965. Bioenergetics: The molecular basis of biological energy transformations. W.A. Benjamin. New York. 258p.
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol.* 68:253-278.
- Levine, R.L., N. Wehr, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter. 2000. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. In: S.M. Keyse (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 99. Stress Response: Methods and Protocols. Springer, pp.15-24.
- Li, Y., Qin, J.G., Abbott, C.A., Li, X., Benkendorff, K. 2007. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R2353-2362.
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 674:137-147.
- Lomax, C.A., J.F. Henderson. 1973. Adenosine formation and metabolism during adenosine triphosphate catabolism in ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.* 33:2825-2829.
- Lu, W., Y. Hu, G. Chen, Z. Chen, H. Zhang, F. Wang, L. Feng, H. Pelicano, H. Wang, M.J. Keating, J. Liu, W. McKeenan, H. Wang, Y. Luo, P. Huang. 2012. Novel role of NOX in supporting aerobic glycolysis in cancer cells with mitochondrial dysfunction and as a potential target for cancer therapy. *PLoS Biol.* 10:e1001326.
- Lucas, A. 1996. Bioenergetics of aquatic animals. Taylor and Francis, USA. 169p.
- Maguire, J.A., P.G. Fleury, G.M. Burnell. 1999. Some methods for quantifying quality in the scallop *Pecten maximus* (L.) *J Shellfish Res.* 18:59-66.
- Maguire, J.A., S. Jenkins, G.M. Burnell. 2002. The effects of repeated dredging and speed of tow on undersized scallops. *Fish Res.* 58:367-377.
- Magwere, T., R. Pamplona, S. Miwa, P. Martinez-Diaz, M. Portero-Otin, M.D. Brand, L. Partridge. 2006. Flight activity, mortality rates, and lipoxidative damage in *Drosophila*. *J Gerontol. A* 61:136-145.

- Marazza, D., P. Bornens, Y. Le Gal. 1996. Effect of ammonia on survival and adenylate energy charge in the shrimp *Palaemonetes varians*. *Ecotox Environ Safe.* 34, 103–108.
- Martínez-Antonio, E. 2014. Niveles de nutrientes residuales, ecoeficiencia, desempeño productivo y estado fisiológico de *Litopenaeus vannamei* a diferentes niveles de proteína pro efecto de micro biota en cultivos hiperintensivos. Baja California Sur. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México.
- Martínez-Palacios, C.A., L. G. Ross, L. Jimenez Valenzuela. 1996. The effects of temperatura and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *J Aqua Trop.* 11 59-65.
- Matsumoto, M., H. Yamanaka. 1990. Post-mortem biochemical changes in the muscle of kuruma prawn during storage and evaluation of the freshness. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:1145–1149.
- McMahon, B.R., D.G. McDonald, C.M. Wood. 1979. Ventilation, Oxygen Uptake and Haemolymph Oxygen Transport, Following Enforced Exhausting Activity in the Dungeness Crab Cancer Magister. *J Exp Biol.* 80:271-285.
- Mendes, R., R.Quinta, M.L Nunes. 2001. Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. *Eur Food Res. Technol.* 212:141–146.
- Mercier, L., E. Palacios, Á. I. Campa-Córdova, D. Tovar-Ramírez, R. Hernández-Herrera, I.S. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258:633-640.
- Messens, J., N. Rouhier, J.-F. Collet. 2013. Redox homeostasis, in: U. Jakob, D. Reichmann (Eds.), *Oxidative Stress and Redox Regulation*. Springer, Netherlands, 59-84.
- Moal, J., J.F. Samain, B. Alain, J.R. Le Coz. 1987. Approche de l'état physiologique de l'huitre creuse *Crassostrea gigas* au cours d'un cycle saisonnier à Marennes-Olerón. *Haliotis* 16:497–511.
- Moal, J., J.R. Le Coz, J.F. Samain, J.Y. Daniel. 1989. Nucleotides in bivalves: Extraction and analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Comp Biochem Physiol B* 93:307–316.
- 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.
- Molinero, A., E. Gomez, J. Balasch, L. Tort. 1997. Stress by fish removal in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. A time course study on the remaining fish in the same tank. *J App Aquaculture* 7:1–12.
- More, N., R.M. Daniel, H.H. Petach. 1995. The effect of low temperatures on enzyme activity. *Biochem J.* 305:17–20.
- Morris, S., A.M. Adamczewska. 2002. Utilisation of glycogen, ATP and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. *Comp Biochem Physiol A.* 133:813–825.
- Morris, S., J. Callaghan. 1998. The emersion response of the Australian Yabby *Cherax destructor* to environmental hypoxia and the respiratory and metabolic responses to consequent air-breathing. *J Comp Physiol B.* 168:389–398.



- Morris, S., W.J. van 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.
- Mugnier C., C. Justou. 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *J Exp Mar Biol Ecol.* 309:35-46.
- Nelson, D., M. Cox. 2001. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. Third edition. New York. 1152p
- Nikolaidis, M.G., A. Kyparos, C. Spanou, V. Paschalis, A.A. Theodorou, I.S. Vrabas. 2012. Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *J Exp Biol.* 215:1615-1625.
- Onnen, T., E. Zebe. 1983. Energy metabolism in the tail muscles of the shrimp *Crangon crangon* during work and subsequent recovery. *Comp Biochem Physiol A.* 74:833–838.
- Pacheco-Aguilar, R., E. Marquez-Ríos, M.E. Lugo-Sánchez, G. García-Sánchez, Maeda-Martínez A., V.M. Ocano-Higuera. 2008. Postmortem changes in the adductor muscle of Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) during ice storage. *Food Chem.* 106:253-259.
- Palacios, E., A.M. Ibarra, I. S. Racotta. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185:353-371.
- Parrilla-Taylor, D.P., T. Zenteno-Savín. 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture* 318, 379-383.
- 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., A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, C. Rosas. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637-650.
- 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 B.* 106:395–400.
- Pérez, H.M., X. Janssoone, H. Guderley. 2008. Tonic contractions allow metabolic recuperation of the adductor muscle during escape responses of giant scallop *Placopecten magellanicus*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 360: 78-84.
- Persky, A.M., P.S. Green, L. Stuble, C.O. Howell, L. Zaulyanov, G.A., Brazeau, 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.
- Pontén, U., R.A. Ratcheson, B.K. Siesjö 1973. Metabolic changes in the brains of mice frozen in liquid nitrogen. *J Neurochem.* 21:1121–1126.
- Powers, S.K., M.J. Jackson. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88:1243-1276.

- Promwikorn, W., P. Kirirat, P. Thaweethamsewee. 2004. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakarin J Sci Technol. 26:765-772.
- Racotta, I.S., R. Delgado-Duran, S. Zamora-Méndez, M. Toledo-Cuevas, C. Martínez-Palacios. 2004. Respuestas metabólicas de estrés en tilapia (*Oreochromis niloticus*) y pez blanco de Pátzcuaro (*Chirsotoma estor estor*). 47th Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Veracruz, México. p 229
- Racotta, I.S., E. Palacios. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World Aquaculture Soc. 29:351-356.
- Racotta, I.S., 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: 269–275.
- Raffin, J.P., M.T. Thébault. 1991. A specific AMP deaminase assay and its application to tissue homogenates. Comp Biochem Physiol B. 99:125–127.
- Raffin, J.P., M.T. Thébault. 1996. Modelization of coordinated changes of adenylate energy charge and ATP/ADP ratio: Application to energy metabolism in invertebrate and vertebrate skeletal muscle. C. R. Acad. Sci., III. 319:9-15.
- Reid, M.B., F.A. Khawli, M.R. Moody. 1993. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. J Appl Physiol. 75:1081-1087.
- Robergs, R.A., F. Ghasvand, D. Parker. 2004. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. Am J Physiol. 287:R502-R516.
- Rolfe, D.F.S., G.C. Brown. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standar metabolic rate in mammals. Physiol Rev. 77:731-759.
- Ross, L.G., B. Ross. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Blackwell Publishing. Third edition. Oxford. 222p.
- Ross, L.G., J. Sanchez Blanco, C.A. Martínez-Palacios, I. S Racotta, M. Toledo Cuevas. 2007. Anaesthesia, sedation and transportation of juvenile *Chirostoma estor estor* Jordan 1879 using benzocaine and hypothermia. Aquac. Res. 38:909–917.
- Ruben, E.A., M.S. Chapman, J.D. Evanseck. 2005. Generalized Anomeric Interpretation of the “High-Energy” N-P Bond in N-Methyl-N'-phosphorylguanidine: Importance of Reinforcing Stereoelectronic Effects in “High-Energy” Phosphoester Bonds. J AM Chem Soc. 127:17789-17798.
- Sallam, K.I. 2007. Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. Food Chem. 101:592–600.
- Samain, J.F., H. McCombie. 2007. Mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest. Ifremer/Quae.
- Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, C. Rosas. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture 198:3-28.
- Saydmohammed, M., A. K. Pal. 2009. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 298:162-167.
- Schafer, F.Q., G.R. Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic. Biol. Med. 30:1191-1212.
- Shimada, R., H. Ushio, H. Yamanaka. 2000. Initial changes in ATP equivalents in the post-mortem muscles of three species of lobster. Fish. Sci. 66:755–760.



- Spanopoulos-Hernández, M., C.A. Martínez-Palacios, R. C. Vanegas-Pérez, C. Rosas, L. G. Ross. 2005. The combined effects of salinity and temperature on the oxygen consumption of juvenile shrimps *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson, 1874). *Aquaculture*. 244:341-348.
- Su, B.-K., J.-C. Chen. 2008. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 24:74-81.
- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. In: Taniguchi, N., Gutteridge, J. (Eds.), *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, Oxford University Press, New York, pp. 91-95.
- Tavares-Sánchez, O.L., G.A. Gómez-Anduro, X Felipe-Ortega, M.A. Islas-Osuna, R.R. Sotelo-Mundo, C. Barillas-Mury, G. Yepiz-Plascencia. 2004. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comp Biochem Physiol B.* 138:331-337.
- Thébault, M.T., A. Biegniewska, J.P. Raffin, E.F. Skorkowski. 1996. Short term cadmium intoxication of the shrimp *Palaemon serratus*: Effect on adenylate metabolism. *Comp Biochem Physiol C.* 113:345-348.
- Thébault, M.T., J.P. Raffin. 1991. Seasonal variations in *Palaemon serratus* abdominal muscle metabolism and performance during exercise, as studied by <sup>31</sup>P NMR. *Mar Ecol Prog Ser.* 74:175-183.
- Thébault, M.T., J.P. Raffin, A.M. Picado, E. Mendonça, E.F. Skorkowski, Y. Le Gal. 2000. Coordinated changes of adenylate energy charge and ATP/ADP: Use in ecotoxicological studies. *Ecotox Environ Safety.* 46:23-28.
- Thébault, M.T., J.P. Raffin, R. Pichon, A. Smine. 1994. P-31 NMR studies of the metabolic changes in the prawns *Palaemon serratus* and *P. elegans* during exercise. *Mar Ecol Prog Ser.* 111:73-78.
- 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 A* 116:337-340.
- Thibodeaux, L.K., K.G. Burnett, L.E. Burnett. 2009. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *J Exp Biol.* 212:3428-3439.
- Thomas, P.M., H.A. Bremner, N.W. Pankhurst. 2000. Quantitative extraction of nucleotides from frozen muscle samples of Atlantic salmon (*Salmo Salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*): Effects of time taken to sample and extraction method. *J Food Biochem.* 24:147-159.
- Trasviña-Arenas, C.H., A. Garcia-Triana, A.B. Peregrino-Uriarte, G. Yepiz-Plascencia. 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comp Biochem Physiol B.* 164:44-52.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem.* 11:256-265.
- 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.

- Voet, D, Voet, J. G., Pratt, C.W. 2005. Fundamentals of Biochemistry .John Wiley & Son. Second edition. 1072p.
- Wang, D., F. Li, Y.Chi, J. Xiang. 2012. Potential relationship among three antioxidant enzymes in eliminating hydrogen peroxide in penaeid shrimp. *Cell Stress Chaperones* 17:423-433.
- Wang, W.-N., A.L. Wang, L. Chen, Y. Liu, R.Y. Sun. 2002. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles. *Aquat Toxicol.* 60:75–83.
- Wang, W.-N., A.L. Wang, Y. Liu, J. Xiu, Z.B. Liu, R.Y. Sun. 2006. Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* 256:624–630.
- Wang, W.-N., A.-L. Wang, D.-M. Wang, L.-P. Wang, Y. Liu, R.-Y. Sun. 2003. Calcium, phosphorus and adenylate levels and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activities of prawn, *Macrobrachium nipponense*, during the moult cycle. *Comp Biochem Phys A.* 134: 297-305.
- Wang, Y., G.J. Heigenhauser, C.M. Wood. 1994. Integrated responses to exhaustive exercise and recovery in rainbow trout white muscle: Acid-base, phosphogen, carbohydrate, lipid, ammonia, fluid volume and electrolyte metabolism. *J Exp Biol.* 195:227–258.
- Wine, J.J., F.B. Krasne. 1972. The organization of escape behaviour in the crayfish. *J Exp Biol.* 56 1-18.
- Xu, K., S. Terakawa. 1999. Fenestration nodes and the wide submyelinic space form the basis for the unusually fast impulse conduction of shrimp myelinated axons. *J Exp Biol* 202:1979-1989.
- 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 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. Baja California Sur. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México.
- Zenteno-Savín, T., R. Saldierna, M. Ahuejote-Sandoval. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp Biochem Physiol C.* 142:301-308.
- Zhang, P., X. Zhang, J. Li, G. Huang. 2006. Swimming ability and physiological response to swimming fatigue in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol A.* 145:26-32.
- Zhang, P., X. Zhang, J. Li, G. Huang. 2007. The effects of temperature and salinity on the swimming ability of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol A.* 147:64-69.
- Zhang, P.D., X.M. Zhang, J. Li. 2011. Physiological responses to swimming fatigue of juvenile white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to different current velocities, temperatures and salinities. *Afr J Biotechnol.* 10:851-853.
- 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.
- zur Nedden, S., R. Eason, A.S. Doney, B.G. Frenguelli. 2009. An ion-pair reversed-phase HPLC method for determination of fresh tissue adenine nucleotides avoiding freeze-thaw degradation of ATP. Anal Biochem. 388:108–114.

**ANEXO I. Efecto de la concentración de metanol en la fase móvil sobre los tiempos de retención de estándares de nucleótidos de adenina**

Efecto de dos concentraciones del modificador orgánico en la fase móvil para el análisis de nucleótidos por HPLC.

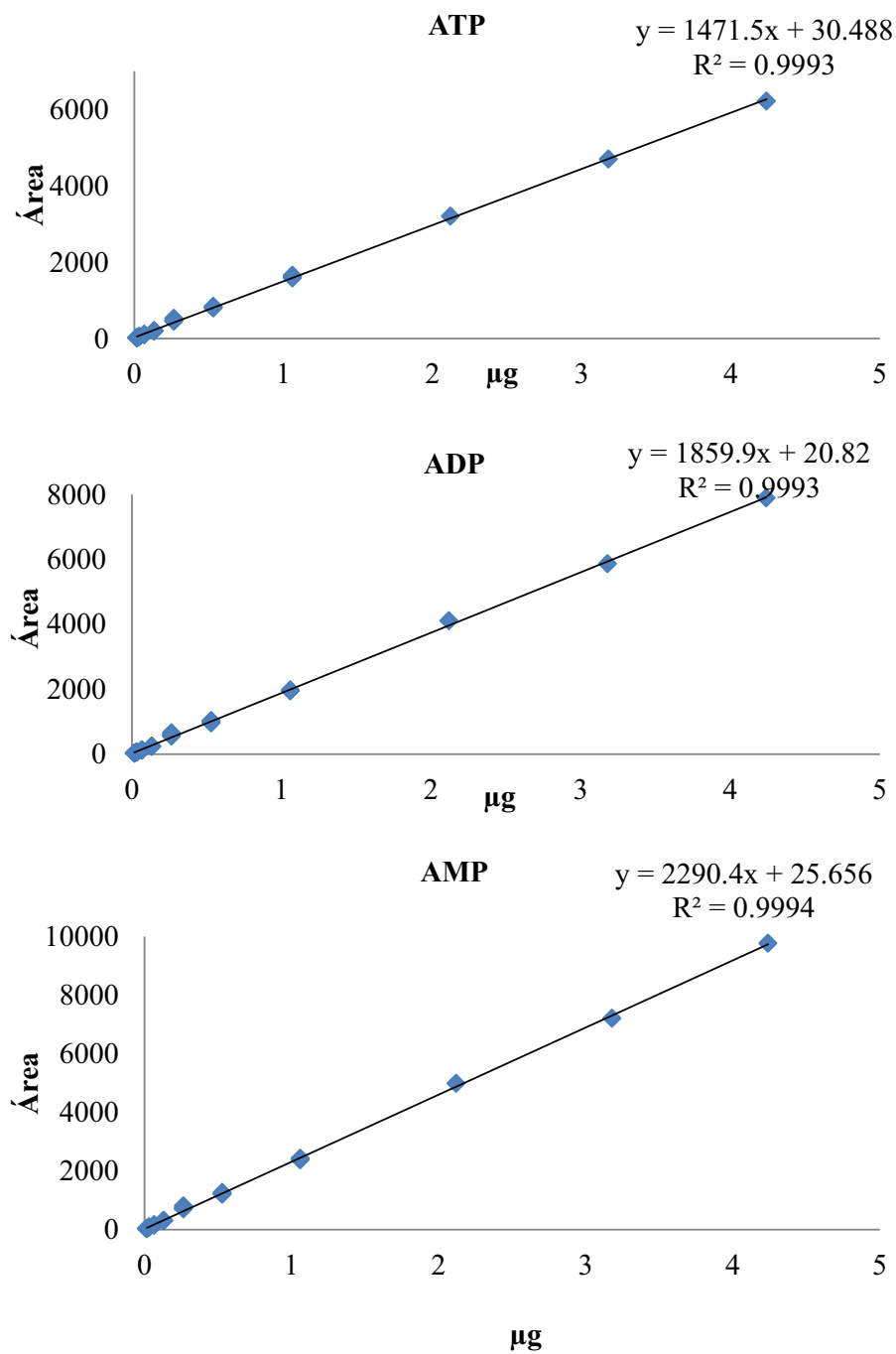
Con el fin de que el tiempo de retención de los nucleótidos analizados permitiera su fácil identificación en el menor tiempo posible, se compararon los tiempos de retención de una mezcla de estándares de nucleótidos (ATP, ADP, AMP, GTP y GDP) utilizando una fase móvil al 5% de metanol (modificador orgánico) y otra al 8%.

Entre más alta fue la concentración de metanol, menor fue el tiempo de retención, tal como se aprecia a continuación. Los datos corresponden a la misma mezcla de estándares que se inyectó utilizando fase móvil con diferente porcentaje de metanol, al 5% y 8% de metanol.

**Tabla XIX.** Efecto de la concentración de metanol en la fase móvil sobre los tiempos de retención de estándares de nucleótidos de adenina.

	<b>Concentración de metanol</b>	
	<b>5%</b>	<b>8%</b>
<b>Nucleótido</b>	<b>TR</b>	<b>TR</b>
ATP	26.6	15.4
ADP	12.8	8.68
GTP	10.5	7.12
AMP	6.67	5.20
GDP	5.83	4.54

TR: tiempos de retención

**ANEXO II. Curvas de calibración de nucleótidos**

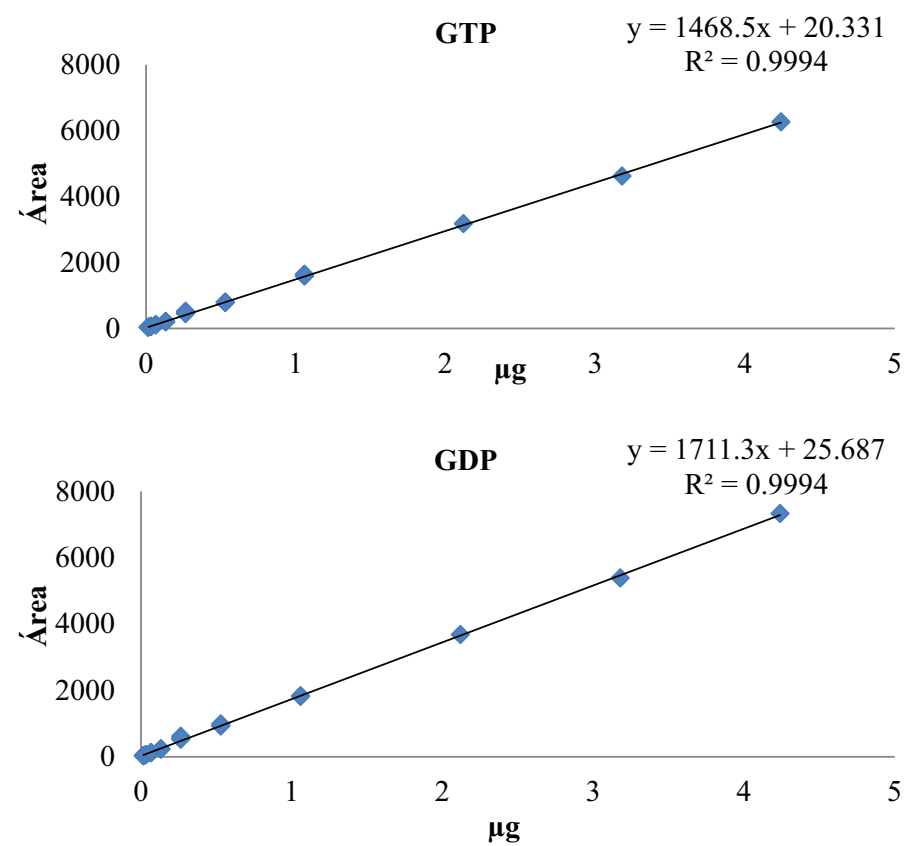
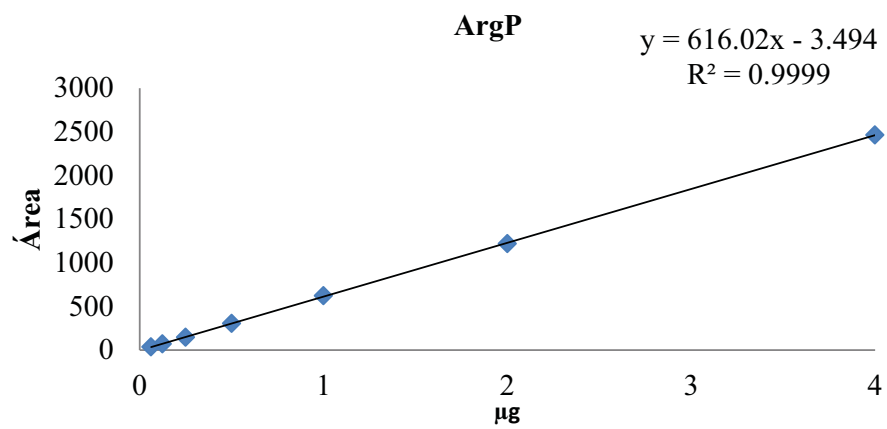


Figura 6. Curvas de calibración de nucleótidos

**ANEXO III. Curva de calibración arginin fosfato****Fig. 7. Curva de calibración arginin fosfato**

**ANEXO IV.** Artículos derivados de la tesis

Robles-Romo A., O. Arjona, I.S. Racotta. Influence of sampling, storage, processing and optimal experimental conditions on adenylic energy charge in penaeid shrimp. Archives of Biological Sciences. En prensa.

Robles-Romo A., T. Zenteno-Savín, I.S. Racotta. Bioenergetic status and oxidative stress during escape response until exhaustion in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Sometido.