



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS BIOACTIVOS EN
CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus*
vannamei BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS Y SU
MODULACIÓN CON ALIMENTOS ELABORADOS
CON SUBPRODUCTOS MARINOS.

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

Celene Lizeth Navarro Hurtado

La Paz, Baja California Sur, septiembre del 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 20:30 horas del día 28 del Mes de agosto del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

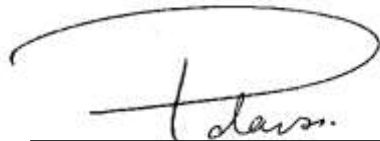
"PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS BIOACTIVOS EN CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO *Litopenaeus vannamei* BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS Y SU MODULACIÓN CON ALIMENTOS ELABORADOS CON SUBPRODUCTOS MARINOS "

Presentada por el alumno:

CELENE LIZETH NAVARRO HURTADO

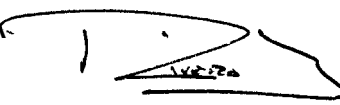
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA

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



Dra. Elena Palacios Mechetnov
Directora de Tesis

LA COMISIÓN REVISORA




Dr. Roberto Civera Cerecedo
Co-Tutor




Dr. Edouard Kraffe de Laubarede
Co-Tutor



Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva
Co-Tutor



Dr. Hugo Sergio García Galindo
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Directora
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Roberto Civera Cerecedo
Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Edouard Kraffe
Co-Tutor
Université de Bregtane Occidentale

Dr. Hugo Sergio García Galindo
Co-Tutor
Instituto Tecnológico de Veracruz

Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva
Co-Tutor
Universidad Autónoma de Sinaloa

Comité Revisor de Tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Dr. Roberto Civera Cerecedo
Dr. Edouard Kraffe
Dr. Hugo Sergio García Galindo
Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva

Jurado de Examen

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Dr. Roberto Civera Cerecedo
Dr. Edouard Kraffe
Dr. Hugo Sergio García Galindo
Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva

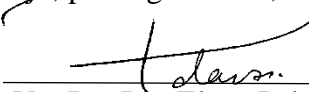
Suplentes

Dr. Alberto Peña Rodríguez
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Resumen

Entre los principales problemas de la camaronicultura está la mortandad ocasionada por estrés al manipular camarones que frecuentemente ocurre durante la siembra, desdoblamiento y cosecha. En varios modelos animales se ha reportado que el estrés está regulado por la síntesis de prostaglandinas (PG) producidas enzimáticamente a partir del ácido araquidónico (ARA) por la cicloxigenasa (COX), pero el estrés también puede afectar la producción no enzimática de lípidos con actividad biológica, como isoprostanos y productos oxidados de colesterol (COP, por sus siglas en inglés). En el presente trabajo se realizaron tres bioensayos con el fin de evaluar la producción de lípidos bioactivos en juveniles de camarón *Litopenaeus vannamei*. En el primero bioensayo, se evaluaron tres alimentos: un Control con harina de pescado y dos alimentos experimentales, uno con harina de vísceras de almeja Catarina y otro con harina de vísceras de calamar, sustituyendo al 10% la harina de pescado en un bioensayo de crecimiento con duración de 60 días. Al final del bioensayo, se aplicó a los camarones un estrés por manipulación, exposición aérea de 15 minutos y después un periodo de recuperación de 30 minutos en agua. La sustitución parcial con calamar tuvo efectos positivos en el crecimiento y consumo del alimento de los camarones, mientras que los camarones alimentados con almeja presentaron mejor respuesta (supervivencia, crecimiento, ganancia de peso, supervivencia post-estrés) al estrés; también se observó mayor expresión relativa de genes de enzimas antioxidantes en este tratamiento (catalasa y glutatión peroxidasa). Ambos alimentos con 10% de subproductos redujeron las PG y los hidroperóxidos en los camarones después del estrés por manipulación. Los subproductos de Catarina y calamar probablemente contienen antioxidantes (pigmentos, polifenoles, flavonoides), HUFA, zinc y otros componentes nutrimentales que pueden ayudar a contrarrestar los efectos pro-oxidantes de un estrés. En el segundo bioensayo se determinó el efecto de distintas dosis de ASA (50, 100, 200 y 400 mg de ASA por kg de biomasa de camarón) en el alimento a lo largo de 24 horas (0, 1, 3, 6 y 24 horas) sobre la producción de PG en camarones. Se observó usando análisis histológico que la dosis más alta, de 400 mg/kg, posiblemente produce daño en las branquias. Las dosis de 100 y 200 mg/kg fueron efectivas en reducir las PG por 3 horas post-ingesta, con un efecto significativo inmediato sobre la síntesis de COX en camarones. En el 3er bioensayo se usó una dosis de ASA de 100 mg/kg y se evaluó su efecto post-estrés por manipulación en camarones. El estrés aumentó significativamente los niveles de PG en branquias, y en camarones alimentados con ASA los niveles fueron significativamente menores, mientras que los hidroperóxidos no fueron afectados por ASA. El uso de ASA en los alimentos para camarón previo a un estrés por manipulación podría ser una forma fácil y práctica de mejorar la supervivencia. Sin embargo, se requieren más pruebas para evaluar la condición fisiológica del camarón expuesto a este fármaco.

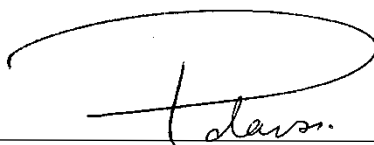
Palabras Claves: Ácido acetilsalicílico; ácido araquidónico; alimentos alternativos; crustáceos; estrés por manejo; prostaglandinas; subproductos marinos.


Vo. Bo. Dra Elena Palacios Mechetnov
Directora de Tesis

Summary

Shrimp mortality after stress from handling that frequently occurs during stocking, unfolding, and harvesting is one of the biggest problems in aquaculture. Stress has been reported to be regulated by prostaglandin (PG) synthesis by cyclooxygenase (COX) from arachidonic acid (ARA) in several animal models, but stress can also increase the non-enzymatic synthesis of bioactive lipids, like isoprostanes and cholesterol oxidation products (COP). In the present work, three bioassays were conducted to evaluate the production of bioactive lipids mediated by COX in juvenile *Litopenaeus vannamei*. In the first bioassay, three feeds were evaluated: a Control (containing fishmeal) and two experimental diets, one with Catarina scallop viscera meal and another with squid viscera meal at 10% dietary level partially replacing the fish meal, in 60-day growth bioassay. At the end of the trial, handling stress, 15 minutes of aerial exposure and a recovery period of 30 minutes in water were applied. The partial substitution with squid had a positive effect on shrimp growth rate and feed ingestion, while shrimp fed scallop had a better recovery (survival, growth, weight gain, post-stress survival) after stress; they also had a higher rate of relative expression of antioxidant enzyme genes in this treatment (catalase and glutathione peroxidase). Both feeds with 10% by-products reduced PG and hydroperoxide levels in shrimp after the handling stress. Squid and scallop byproducts probably contain antioxidant (pigments, polyphenols, flavonoids), HUFA, zinc and other nutrients that can neutralize the effects pro-oxidants of stress. In the second bioassay, the effect of different doses of ASA (50, 100, 200 and 400 mg/ kg of ASA per shrimp biomass) in the feed over 24 hours (0, 1, 3, 6, 12 and 24 hours) on PG production in shrimp was analyzed. The higher ASA dose (400 mg/kg) produced a negative effect on gills analyzed by histology. The 100 to 200 mg/kg ASA doses were effective in reducing PG after 3 h post-ingestion and had a significant and immediate effect on COX synthesis. In the third bioassay, we used ASA 100 mg/kg to evaluate PG production after handling stress. PG in gills were increased by stress, but not in shrimp fed ASA, while hydroperoxides were not affected by stress. The use of ASA in shrimp feed can be an easy and quick method to increase survival after stress. However, more studies are required to evaluate the physiological status of the shrimp exposed at this drug.

Keywords: Acetylsalicylic acid; alternative feeds; arachidonic acid; crustaceans; handling stress; marine by-products, prostaglandins.



Vo. Bo. Dra Elena Palacios Mechetnov
Directora de Tesis

Dedicatoria

A mi *mamuschka*, por darme tu amor incondicional y sobre todo por ser la luz que mi *padre* destinó para poner sobre mí.

A mis *sweet potatoes* por endulzar mis días, siempre estaré a su lado.

A daddy por ser, estar y aguantar este caminar.

A mis hermanos porque a pesar de la distancia, pensarlos me hace sentir su amor.

A ti papá que, aunque ya no estés, en alguna parte me sonríes y me saludas con Esperanza, mi abuela.

A todos los que están incansablemente.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por ser la institución receptora de mis estudios de posgrado y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (268452).

A los proyectos SEP-CONACYT No. 20375 “Generación de neutracéuticos en organismos de interés acuícola” y SEP-CONACYT No. 60090 “Relación entre apoptosis y prostaglandinas inducidas por cambios de ácidos grasos en fosfolípidos en relación a incrementos de temperatura en moluscos”, por el financiamiento otorgado para el desarrollo y conclusión de esta tesis.

Al comité tutorial integrado por la Dra. Elena Palacios Mechetnov (directora de tesis), el Dr. Roberto Civera Cerecedo (tutor de tesis), el Dr. Edouard Kraffe (tutor de tesis), el Dr. Hugo Sergio García Galindo (tutor de tesis) y el Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva (tutor de tesis), por la atención brindada y sus consejos.

A la Dra. Elena Palacios Mechetnov por sus comentarios, por el todo el apoyo brindado en la elaboración de la tesis y por su paciencia en la duración de la misma.

Al Dr. Roberto Civera Cerecedo (CIBNOR) por su apoyo y su dedicación en la elaboración de los alimentos experimentales y durante el desarrollo de los experimentos.

Al Dr. Hugo Sergio García Galindo por recibirme y por todas las facilidades brindadas durante la estancia de investigación en el Instituto Tecnológico de Veracruz.

Al Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva por su ayuda en la realización de los análisis de pigmentos por HPLC y por sus consejos brindados.

Al Dr. Carlos Rángel Dávalos por las facilidades prestadas en la colecta de camarones en las instalaciones de la Unidad Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.

A la Dra. Crisalejandra Rivera por ayudarme con los análisis de expresión de genes.

A los técnicos de laboratorio: María Olivia Arjona López por su ayuda en los análisis realizados en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos y por sus consejos. A Sandra De la Paz por ayudarme en los muestreos en los experimentos y en la duración de los mismos en el Laboratorio de Nutrición Acuícola. A Saúl Zamora Méndez por su ayuda en los

experimentos y muestreos. A María del Carmen Rodríguez Jaramillo por su ayuda en los análisis histológicos y María Eulalia Meza por ayudarme en los cortes histológicos. A Rosa Linda Salgado García por prestarme material y equipo del Laboratorio de Metabolismo Energético.

A todos los que me ayudaron en alguna parte de la realización de este trabajo: primero que nada, a Lalo, Bryan, Yazmín, Paulina, Ericka, Eliza y Juan Carlos por su invaluable ayuda durante los experimentos.

A Daniela Peña Arias por su ayuda durante los análisis de COP en el laboratorio de Postcosecha en Veracruz. A Libertad por su ayuda en el laboratorio de Metabolismo de Lípidos.

A mis roomies Vivi, Carlos y Victoria, gracias por hacer tan placentera mi estancia en Veracruz.

A Elo, Sofy, Esteban y Oly por sus palabras de aliento y ayuda.

A mi familia que tanto amo.

Contenido

| | |
|---|------|
| Resumen | i |
| Summary | ii |
| Dedicatoria | iii |
| Agradecimientos | iv |
| Contenido | vi |
| Lista de figuras | x |
| Lista de tablas | xiii |
| Abreviaturas | xvi |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 Alternativas al uso de harina de pescado en cultivo de camarón..... | 4 |
| 2.2 Estrés en crustáceos..... | 7 |
| 2.3 Antioxidantes y HUFA..... | 10 |
| 2.4 Ácidos grasos y su oxidación..... | 12 |
| 2.5 Ciclooxygenasas y prostaglandinas | 17 |
| 2.6 Esteroles y su oxidación..... | 23 |
| 2.7. Inhibidores de COX en invertebrados marinos..... | 26 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 28 |
| 4. HIPÓTESIS | 29 |
| 5. OBJETIVOS | 30 |
| 5.1 Objetivo general..... | 30 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 30 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 31 |
| 6.1. Evaluación del efecto de alimentos que contienen subproductos marinos sobre la producción de lípidos bioactivos en camarones sometidos a estrés..... | 31 |
| 6.1.1 Obtención de los ingredientes y elaboración de harinas experimentales | 31 |
| 6.1.2 Fabricación de los alimentos experimentales | 32 |
| 6.1.3 Hidroestabilidad de los alimentos experimentales | 34 |
| 6.1.4 Análisis de lípidos en los alimentos experimentales | 34 |
| 6.1.5 Bioensayo de crecimiento..... | 36 |
| 6.1.6 Reto de estrés..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 6.1.7 Preparación de muestras para análisis de lípidos en camarón..... | 38 |
| 6.1.8 Expresión relativa de genes de enzimas antioxidantes..... | 47 |
| 6.1.9 Análisis estadísticos..... | 49 |
| 6.2 Determinación de la dosis, el tiempo y la administración más adecuada de un inhibidor de ciclooxigenasas suministrado en el alimento y evaluación de su efecto sobre la producción de prostaglandinas en camarones..... | 50 |
| 6.2.1 Origen de los organismos..... | 50 |
| 6.2.2 Fabricación de alimentos Control y con ASA..... | 50 |
| 6.2.3 Bioensayo y muestreos..... | 53 |
| 6.2.4 Análisis histológico..... | 54 |
| 6.2.5 Apoptosis celular mediante la detección de la fragmentación del ADN..... | 56 |
| 6.2.6 Determinación de PGEM..... | 57 |
| 6.2.7 Análisis estadísticos..... | 57 |
| 6.3. Evaluación del efecto de un inhibidor de ciclooxigenasas sobre la producción de prostaglandinas y la supervivencia en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea..... | 58 |
| 6.3.1 Origen de los organismos..... | 58 |
| 6.3.2. Fabricación de alimentos experimentales..... | 58 |
| 6.3.3 Reto de estrés..... | 59 |
| 6.3.4 Análisis bioquímico..... | 62 |
| 6.3.5 Análisis de lípidos..... | 62 |
| 6.3.6 Determinación de PGEM..... | 62 |
| 6.3.7 Determinación de hidroperóxidos (LOOH)..... | 62 |
| 6.3.8 Análisis estadísticos..... | 63 |
| 7. RESULTADOS..... | 64 |
| 7.1 Evaluación del efecto de alimentos que contienen subproductos marinos sobre la producción de lípidos bioactivos en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea..... | 64 |
| 7.1.1 Parámetros zootécnicos..... | 64 |
| 7.1.2 Alimentos..... | 65 |
| 7.1.3 Camarones..... | 67 |

| | |
|---|-----|
| 7.2. Determinación de la dosis, el tiempo y la administración más adecuada de un inhibidor de ciclooxigenasas suministrado en el alimento y evaluar su efecto sobre la producción de prostaglandinas en camarones. | 87 |
| 7.2.1 Determinación de PGEM en un intervalo tiempo/día | 87 |
| 7.2.2 Daño apoptótico en tejidos, área total y atrofia branquial..... | 88 |
| 7.2.3 Expresión relativa de genes <i>GPx</i> , <i>CAT</i> , <i>SOD</i> , y <i>COX</i> | 92 |
| 7.3. Evaluación del efecto de un inhibidor de ciclooxigenasas sobre la producción de prostaglandinas y la supervivencia en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea. | 95 |
| 7.3.1 Respuesta al reto de estrés..... | 95 |
| 7.3.2 Variables bioquímicas en camarón..... | 96 |
| 7.3.3 Lípidos en camarón | 97 |
| 7.3.4 Contenido de PGEM y LOOH en camarones..... | 97 |
| 7.3.5 Análisis de PCA de resultados | 101 |
| 8. DISCUSIÓN | 103 |
| 8.1 Evaluación del efecto de alimentos que contienen subproductos marinos sobre la producción de lípidos bioactivos en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea. | 103 |
| 8.1.1 <i>Bioensayo de crecimiento de camarón con alimentos experimentales</i> | 103 |
| 8.1.2 <i>Respuestas a reto de estrés en camarones alimentados con alimentos experimentales</i> | 106 |
| 8.2 Determinación de la dosis, el tiempo y la administración más adecuada de un inhibidor de ciclooxigenasas suministrado en el alimento y evaluar su efecto sobre la producción de prostaglandinas en camarones. | 112 |
| 8.3 Evaluación del efecto de un inhibidor de ciclooxigenasas sobre la producción de prostaglandinas y la supervivencia en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea. | 117 |
| 9. CONCLUSIONES | 122 |
| 10. LITERATURA CITADA | 123 |
| 11. ANEXOS | 140 |
| 11.1 Preliminares en el análisis de PGEM..... | 140 |
| 11.1.1 <i>Pruebas de detección de PGEM usando distintos métodos de procesamiento en camarón</i> | 140 |
| 11.1.2 <i>Pruebas de detección de PGEM usando distintas cantidades de tejidos</i> | 140 |

| | |
|--|-----|
| 11.1.3 <i>Pruebas de detección de PGEM en distintos tejidos.</i> | 140 |
| 11.2 Determinación de PGEM con ASA suministrado en agua | 142 |
| 11.3 Determinación de ácido acetilsalicílico (ASA) en hemolinfa de camarón. | 143 |
| 11.4 Concentración de esteroides y ácidos grasos de los alimentos del Objetivo 1 | 146 |
| 11.5 Artículo aceptado | 148 |
| 11.6 Artículo sometido..... | 170 |

Lista de figuras

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Sistemas de defensas antioxidantes | 9 |
| Figura 2. | Localización de los carotenoides en las membranas biológicas | 10 |
| Figura 3. | Ruta de biosíntesis de HUFA C20 y C22 a partir de los precursores n-3, n-6 y n-9 | 12 |
| Figura 4. | Rutas de síntesis de eicosanoides a partir de ARA (serie 2) y EPA (serie 3) | 14 |
| Figura 5. | Mecanismo de producción de isoprostanos-F2 a partir de la peroxidación de ARA catalizado por radicales libres | 15 |
| Figura 6. | Diferencias estructurales de COX-1 y COX-2 en humanos | 17 |
| Figura 7. | Síntesis de diferentes prostaglandinas en distintos tejidos | 18 |
| Figura 8. | Mecanismo de acción de ASA | 19 |
| Figura 9. | Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y mediadores lipídicos específicos de resolución | 20 |
| Figura 10. | Rutas de oxidación del colesterol | 23 |
| Figura 11. | Diagrama de la hipótesis planteada | 27 |
| Figura 12. | Técnica de determinación de PGEM por medio del kit ELISA (Cayman) | 40 |
| Figura 13. | Extracción de COP en laboratorio de postcosecha en Instituto Tecnológico de Veracruz, México | 43 |
| Figura 14. | Diseño experimental del bioensayo 2 (Dosis ASA). | 50 |
| Figura 15. | Bolsitas usadas para evitar que fuera ingerido el alimento en el tiempo 0 | 51 |
| Figura 16. | Toma de muestras de camarón durante el muestreo del bioensayo 2 (Dosis-ASA) | 52 |
| Figura 17. | Diseño de reto de estrés | 57 |
| Figura 18. | Supervivencia (%) después del reto de estrés por manipulación y exposición aérea de camarones alimentados con los alimentos experimentales | 64 |
| Figura 19. | Coloración blanca (%) después del reto de estrés por manipulación y exposición aérea de camarones alimentados con los alimentos experimentales | 64 |
| Figura 20. | Camarones alimentados con los alimentos experimentales, que no presentaron ninguna respuesta post-estrés | 65 |
| Figura 21. | ARA (%) en fracción de acilglicéridos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 68 |
| Figura 22. | ARA (%) en la fracción de fosfolípidos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 68 |
| Figura 23. | COP totales (mg/100g) en el músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 70 |
| Figura 24. | PGEM ($\mu\text{g}/\text{mg}$) en branquias de camarones alimentados con los | 75 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | |
| Figura 25. | Hidroperóxidos ($\mu\text{g/g}$) en branquias de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 76 |
| Figura 26. | Concentración de 8-isoprostanos ($\mu\text{g/mg}$) en músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 76 |
| Figura 27. | Expresión de ARNm de hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 78 |
| Figura 28. | A) Análisis de componentes principales, que muestra el factor 1 y 2, B) Análisis de componentes principales que muestra el factor 1 y 3 de variables seleccionadas en camarones cultivados con alimento Control y alimentos con subproductos marinos, sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 82 |
| Figura 29. | Concentración de PGEM ($\mu\text{g/mg}$ en peso húmedo) en branquias de camarón del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA | 83 |
| Figura 30. | Representación a lo largo del tiempo de la concentración de PGEM ($\mu\text{g/mg}$ en peso húmedo) en branquias de camarón del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA | 84 |
| Figura 31. | Nivel de daño apoptótico en tejidos de camarón del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA | 85 |
| Figura 32. | Atrofia branquial (medida en área total branquial) en camarones del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA | 85 |
| Figura 33. | Tejidos de camarón positivos a técnica TUNEL | 86 |
| Figura 34. | Corte histológico de branquias de camarón <i>L. vannamei</i> , donde se observa la atrofia branquial: | 87 |
| Figura 35. | Expresión de ARNm de <i>Glutación peroxidasa</i> en hepatopáncreas de camarones | 88 |
| Figura 36. | Expresión de ARNm de <i>Catalasa</i> en hepatopáncreas de camarones | 89 |
| Figura 37. | Expresión de ARNm de <i>Superóxido dismutasa</i> en hepatopáncreas de camarones | 90 |
| Figura 38. | Expresión de ARNm de <i>Ciclooxigenasa</i> en hepatopáncreas de camarones | 90 |
| Figura 39. | Supervivencia (%) de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA | 92 |
| Figura 40. | Concentración de PGEM en branquias de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA | 95 |
| Figura 41. | Concentración de LOOH en branquias de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA | 95 |
| Figura 42. | Análisis de componentes principales (factor 1 y 2) de la interacción | 97 |

de lípidos (branquias), parámetros zootécnicos y variables bioquímicas (hepatopáncreas) en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 43. | Concentración de PGEM en músculo de camarón en pruebas preliminares de detección de PGEM | 135 |
| Figura 44. | Concentración de PGEM en branquias de camarón en pruebas preliminares de detección de PGEM. | 136 |
| Figura 45. | Concentración de PGEM en hepatopáncreas de camarón en pruebas preliminares de detección de PGEM | 136 |
| Figura 46. | Concentración de PGEM ($\mu\text{g}/\text{mg}$ en peso húmedo) en branquias de camarón suministrado con ASA en agua | 138 |

Lista de tablas

| | | |
|--------------------|---|----|
| Tabla I. | Estudios en camarones donde se sustituye harina de pescado por fuentes animales terrestres | 4 |
| Tabla II. | Estudios en camarones donde se sustituye la harina de pescado por subproductos marinos | 5 |
| Tabla III. | Estudios en camarones sometidos a estrés por manipulación o exposición aérea | 7 |
| Tabla IV. | Estudios en camarones sometidos a estrés por manipulación y por exposición aérea y su efecto sobre expresión de enzimas antioxidantes y actividad de enzimas | 8 |
| Tabla V. | Estudios en invertebrados marinos donde se analizan diversas prostaglandinas | 21 |
| Tabla VI. | Estudios en invertebrados marinos donde se usan inhibidores de COX | 25 |
| Tabla VII. | Composición proximal de las harinas usadas en la fabricación de los alimentos experimentales | 30 |
| Tabla VIII. | Composición en ingredientes (g/100 g, base húmeda) de los alimentos experimentales utilizados en el bioensayo de crecimiento. | 31 |
| Tabla IX. | qPCR oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica de hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea. | 47 |
| Tabla X. | Composición en ingredientes (g/100 g, base húmeda) de los alimentos utilizados en el bioensayo dosis-ASA | 49 |
| Tabla XI. | Composición en ingredientes, proximal y de energía de los alimentos utilizados en el bioensayo 3, de producción de prostaglandinas E ₂ en presencia o no de inhibidor de COX. | 56 |
| Tabla XII. | Parámetros zootécnicos por tratamiento durante el bioensayo de crecimiento | 60 |
| Tabla XIII. | Composición proximal, energía bruta, estabilidad en el agua, clases de lípidos y carotenoides totales de los alimentos para camarón. | 61 |
| Tabla XIV. | Ácidos grasos totales en los alimentos experimentales usados en el bioensayo de crecimiento (% del total de ácidos grasos totales). | 62 |
| Tabla XV. | Esteroles totales (% del total de esteroles) en los alimentos experimentales | 63 |
| Tabla XVI. | Ácidos grasos totales (% del total de ácidos grasos) en la fracción de acilglicéridos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 66 |
| Tabla XVII. | Ácidos grasos totales (% del total de ácidos grasos) en la fracción de fosfolípidos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 67 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| Tabla XVIII. | Ácidos grasos totales (% del total de ácidos grasos) en hepatopáncreas de camarones de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 71 |
| Tabla XIX. | Variables bioquímicas (mg/g) en músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 72 |
| Tabla XX. | Esteroles en músculo (mg/g) de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 72 |
| Tabla XXI. | COP en músculo (mg/100g) de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 73 |
| Tabla XXII. | Variables bioquímicas (mg/g) y carotenoides (mg/100g) en hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 74 |
| Tabla XXIII. | Esteroles (mg/g) en hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 74 |
| Tabla XXIV. | Factores estimados por PCA de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 79 |
| Tabla XXV. | Eigenvalores estimados por PCA de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea | 80 |
| Tabla XXVI. | Supervivencia y respuesta al estrés de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA | 91 |
| Tabla XXVII. | Variables bioquímicas (mg/g de materia seca) en músculo y hepatopáncreas de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA | 93 |
| Tabla XXVIII. | Contenido de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en branquias de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA | 94 |
| Tabla XXIX. | Factores y eigenvalores estimados por análisis de componentes principales de la interacción de lípidos (branquias), parámetros zootécnicos y variables bioquímicas (hepatopáncreas) en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA | 96 |
| Tabla XXX. | Esteroles totales (mg/g) en los alimentos experimentales | 141 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Tabla XXXI. | Concentración de ácidos grasos totales (mg/100g en peso húmedo) en los alimentos experimentales usados en el bioensayo de crecimiento | 142 |
|--------------------|---|-----|

Abreviaturas

| | |
|------------------|--|
| AINES | Antiinflamatorios no esteroideos |
| ARA | Ácido araquidónico |
| ASA | Ácido acetilsalicílico |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| COP | Productos de oxidación de colesterol |
| COX | Ciclooxigenasas |
| <i>GPx</i> | Glutation peroxidasa |
| HUFA | Ácidos grasos altamente insaturados |
| IsoP | Isoprostanos |
| LDL | Proteínas de baja densidad |
| LOOH | Hidroperóxidos |
| LOX | Lipooxigenasas |
| LTX | Leucotrienos |
| MDA | Malonaldehido |
| PG | Prostaglandinas |
| PGE ₂ | Prostaglandinas de la serie E ₂ |
| PGEM | Metabolitos de prostaglandina E |
| PGHS | Prostaglandin H synthase |
| UPS | Unidades prácticas de sal |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| <i>SOD</i> | Superóxido dismutasa |
| TBX | Tromboxanos |

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* es una de las especies de más cultivadas en la industria camaronera. La producción global de esta especie es de aproximadamente 4,158 millones de toneladas (FAO, 2018). En México, la producción media nacional de camarón en el 2018 fue de 228 mil toneladas y el consumo reportado per cápita fue de 1.8 kg al año, en promedio (FAO, 2018). El camarón se considera un producto de lujo por su precio (200-240 pesos/kg). Este se debe a los altos costos de producción: el gasto asociado a la alimentación durante la engorda puede ascender a más de la mitad del gasto de producción de camarones. El precio del aceite y harina de pescado, en enero del 2020 fueron de 1,400 dólares por tonelada y 2,100 dólares la tonelada, respectivamente (FAO, 2020). La inclusión de harina de pescado en el alimento para camarón ha venido disminuyendo considerablemente los últimos 13 años, de 28% a 20% del 2002 al 2008 y se espera que se estabilice en 6% para el 2025, mientras que la inclusión de aceite de pescado ha disminuido de 10% a 0-2% del 2008 al 2018 (Tantikitti, 2014; Malcorps *et al.*, 2019). Se espera que se reduzca la disponibilidad de ambos en el mercado por la disminución en la pesca, por lo que se buscan fuentes alternativas de proteínas y lípidos (Tacon y Metian, 2008).

La harina y aceite de pescado se han reemplazado parcialmente por ingredientes obtenidos de plantas terrestres, principalmente aceite de canola y harina de soya (Bowyer *et al.*, 2013). Esta sustitución no se ha hecho de forma completa dado que las plantas no poseen suficientes niveles de aminoácidos esenciales (tales como lisina, metionina y triptófano), no contienen colesterol (esencial para camarones), ni ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), los cuales tampoco son sintetizados por el camarón. Otra desventaja del uso de plantas terrestres es que son de baja digestibilidad, tienen factores anti-nutricionales y una pobre palatabilidad para el camarón. Todo lo anterior hace necesario complementar las harinas vegetales con harinas y aceites de pescado; para el 2030 se prevé que la harina elaborada a partir de desechos de pescado aumente del 40 al 45%, y la de aceite de pescado aumente del 22 a 28% (Samocho *et al.*, 2004; Norambuena *et al.*, 2013; FAO, 2020).

Una alternativa al uso de harina y aceite de pescado es el uso de subproductos marinos, como son las vísceras (glándula digestiva, branquias, gónadas, huesos, piel, aletas) provenientes de las pesquerías y que no son usadas para consumo humano; estos subproductos son comúnmente arrojados al mar, aunque son ricos en aminoácidos, ácidos grasos, colesterol y antioxidantes (Toyes-Vargas *et al.*, 2016). Además de su posible uso para sustituir aceite y harina de pescado, se ha observado que algunos subproductos pueden ser benéficos para los camarones: Se ha reportado mayor ganancia de peso, mayor contenido de HUFA y menor mortalidad en juveniles de *L. vannamei* alimentados con harina de vísceras de calamar, almeja Catarina o callo de hacha (Toyes-Vargas *et al.*, 2017). En un trabajo previo, observamos incremento en la supervivencia de camarones durante un estrés agudo por manejo usando harina de vísceras de callo de hacha en vez de harina de pescado en el alimento (Navarro *et al.*, 2013). La causa por la cual los camarones alimentados con subproductos son más tolerantes al estrés se desconoce. Los subproductos pueden tener nutrientes que favorecen una mejor condición del camarón, y que no están presentes en los aceites o harina de pescados, aún si son procesados bajo las mismas condiciones y con cuidados a disminuir la oxidación durante el proceso (Toyes-Vargas *et al.*, 2016). En otros trabajos donde se determina la supervivencia al estrés de camarones en relación con la alimentación, se observó que en camarones sometidos a estrés por confinamiento a densidades altas y alimentados con ácido araquidónico (ARA) como suplemento, se disminuye la respuesta de estrés; en estos camarones también se observaron diferencias en los niveles de prostaglandinas (PG) (Aguilar *et al.*, 2010). Las PG son producidas por las enzimas ciclooxigenasas (COX) a partir de ARA ante diferentes tipos de estresores (Van Anholt *et al.*, 2004; Stanley y Miller, 2006). Las PG modulan una serie de respuestas fisiológicas, entre ellas la respuesta inmune, la reproducción, la osmorregulación, etc., pero en altas concentraciones pueden ocasionar necrosis, apoptosis y la muerte del organismo; esto ocurre cuando las PG se sintetizan de forma no enzimática, sino por oxidación de HUFA, en particular cuando no hay suficientes antioxidantes.

En la presente tesis se propone evaluar si el incremento a la resistencia de estrés en camarones alimentados con subproductos se debe a la producción de PG, y qué tanto la producción no enzimática de PG puede ser la responsable de la baja tolerancia a un estrés

por manipulación y exposición aérea. Lo anterior se pretende evaluar con una alimentación rica en antioxidantes para prevenir la producción no enzimática de PG, por un lado, y por otro inhibiendo la producción enzimática de PG usando inhibidores de COX.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alternativas al uso de harina de pescado en cultivo de camarón

En la acuicultura, el gasto asociado a la alimentación durante la engorda puede ascender a más de la mitad del gasto de producción de camarones (Tan y Domini, 1997). La inclusión de harina de pescado en el alimento para camarón ha venido disminuyendo considerablemente los últimos 13 años, (28% a 20 %) y se espera que se estabilice en 6% para el 2025, mientras que la inclusión de aceite de pescado ha disminuido de 10% a 0-2% del 2008 al 2018 (Tantikitti, 2014; Malcorps et al., 2019), siendo éstos costosos (FAO, 2020). La harina y el aceite de pescado son altamente digestibles y tienen un valor nutricional alto debido a que contienen altos niveles de aminoácidos esenciales, minerales, colesterol y ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés) del tipo omega 3 o n-3 (Davis *et al.*, 1993; Gong *et al.*, 2000; González-Félix *et al.*, 2003; Lupatsch *et al.*, 2008). La disponibilidad en el mercado de estos dos ingredientes podría verse comprometida debido a que las capturas y el número de pesquerías se han reducido a través de los años, incrementando sus precios (Tacon y Metian, 2008; Béné *et al.*, 2015). Se ha buscado reemplazar la harina y el aceite de pescado, ya sea de forma parcial o completa, usando como ingredientes plantas (por ejemplo: soya, arroz, canola, cacahuates, chicharos, espirulina, gluten de maíz), para reducir los costos de la fabricación de los alimentos, pero las plantas terrestres carecen de algunos amino ácidos y ácidos grasos esenciales y también de colesterol, los cuales son esenciales para el camarón, además de tener componentes anti nutricionales como por ejemplo: fítatos, saponinas, taninos, lecitinas, etc. (Francis *et al.*, 2001; Browdy *et al.*, 2006; Olsen y Hasan, 2012). También se han usado proteínas de animales terrestres para sustituir la harina de pescado, principalmente proveniente de productos de desecho de carne, plumas y huesos (Tabla I). Sin embargo, estas fuentes no suelen ser ricas en HUFA n-3, aunque sí contienen colesterol, además de que su proceso debe ser tratado cuidadosamente por razones de seguridad microbiológica. En camarones se ha observado una reducción de crecimiento, dada por la deficiencia de HUFA n-3, cuando se les ofreció un alimento a base de harina de carne y huesos (Ye *et al.*, 2011).

Tabla I. Estudios en camarones donde se sustituye harina de pescado por fuentes animales terrestres.

| Referencia | Sustitución | Harina | Resultado |
|--|---|--|--|
| David y Arnold (2000) <i>L. vannamei</i> | Parcial 20,40,60 y 80% | Harina de soya mezclada con harina de subproductos de aves. | No hubo efectos negativos entre los tratamientos. |
| Cheng <i>et al.</i> (2002) <i>L. vannamei</i> | Parcial 33.7 y 100%. | Harina de plumas | El alimento con 33% fue el único con el que se observó crecimiento |
| Tan <i>et al.</i> (2005) <i>L. vannamei</i> | Parcial 20, 30, 40, 50, 60 y 80%. | Harina de huesos y carne | Alimentos con 20 al 60% sin efectos negativos. |
| Browdy <i>et al.</i> (2006) <i>L. vannamei</i> | Parcial 0.5% y 0.1%+10% harina de kelp | Alimento base plantas orgánicas. | Los alimentos a base de plantas fueron tan eficientes como las hechas a base de pescado, pero en cantidad de EPA, DHA y AA fueron bajas. |
| Álvarez <i>et al.</i> (2007) <i>L. vannamei</i> | De 50-100% | Harina de soya en diferentes niveles. | Los mejores resultados se obtuvieron con sustitución al 75%. |
| Cruz-Suárez <i>et al.</i> (2007) <i>L. vannamei</i> | Parcial 35, 50, 65 y 80%. | Harina de subproductos avícolas | Efectos negativos en el consumo y crecimiento. |
| Hernández <i>et al.</i> (2008) <i>L. vannamei</i> | Parcial 25, 35, 45 y 65%. | Harina de carne de cerdo | La sustitución es aceptable solamente hasta 35%. |
| Ye <i>et al.</i> (2011) <i>L. vannamei</i> | Parcial 24.3%, 51.3% y 78.3% | Mezcla de harina de huesos, harina de sangre, harina de aves y harina de gluten de maíz. | Se incrementó el contenido de ceniza, disminución de los niveles de ácidos grasos esenciales, son mejor los alimentos con menor inclusión de harinas |
| Bauer <i>et al.</i> (2012) <i>L. vannamei</i> | Parcial y total 25,50,75 y 100% | Harina de tapetes microbianos y concentrado de soya. | No hay efectos negativos en crecimiento, ganancia de peso, alimento consumido con ningún alimento. |
| Glencross <i>et al.</i> (2014) <i>P. monodon</i> | Total de harina | Subproductos de ave de corral y bioactivo microbiana. | Inclusiones de más de 45% reducen el desempeño del camarón, el compuesto microbiano compensa la reducción del desempeño. |

Se prevé que en 2030 la cantidad total de harina y aceite de pescado producida será superior a la de 2018, en un 1% y un 7%, respectivamente, debido a que el aumento de la producción se obtiene de los desechos y subproductos del pescado de la industria de elaboración (FAO, 2020). Por otro lado, se han hecho varios intentos por sustituir la harina de pescado con diferentes subproductos marinos en los alimentos para camarón (Sudaryono *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005; Cruz-Suarez *et al.*, 2007; Hernández *et*

al., 2008; Ye *et al.*, 2011; Glencross *et al.*, 2014). En la Tabla II se muestra un resumen de trabajos donde se ha sustituido la harina de pescado en alimentos para camarón.

Mientras que el crecimiento y la supervivencia son los principales factores que se toman en cuenta al evaluar la calidad de los alimentos cuando se está incluyendo un ingrediente nuevo, la tolerancia al estrés puede usarse para evidenciar el estado general fisiológico del camarón (Aparicio-Simón *et al.*, 2010; Fotedar y Evans, 2011) y ha sido usado con éxito como predictor de una mayor supervivencia (Palacios *et al.*, 1999) o un mayor rendimiento durante el crecimiento (Álvarez *et al.*, 2004).

Tabla II. Estudios en camarones donde se sustituye la harina de pescado por subproductos marinos.

| Referencia | Sustitución | Harina | Resultado |
|---|-----------------|--|--|
| Sudaryono <i>et al.</i> (1995). <i>P. monodon</i> | Parcial | Subproductos de sardina y langosta. Cabezas de camarón. | Crecimiento y supervivencia similares con dieta comercial. Mayor contenido de proteína con cabezas de camarón y ostión. |
| Hernández <i>et al.</i> 2004 | Parcial | Ostiones enteros. Sustituyeron harina de pescado al 30% con harina de vísceras de atún. | La sustitución de harina de pescado puede hacerse hasta el 40% sin tener efectos negativos en los organismos, aun cuando no hubo diferencias significativas con el alimento Control en cuanto a crecimiento. |
| Amaya <i>et al.</i> (2007) <i>L. vannamei</i> | Parcial y total | Mezcla de harina de soya, harina de gluten de maíz y harina de calamar. | Menor crecimiento con 0% de harina de pescado. La sustitución puede ser hecha al 16% con los alimentos a base de plantas y 1% de harina de calamar. |
| Civera <i>et al.</i> (2011) <i>L. vannamei</i> | Parcial | Harina de subproductos de almeja Catarina. | Mayor digestibilidad comparado con alimento hecho con harina de sardina, eficiente como fuente de proteína. |
| Navarro <i>et al.</i> (2013) <i>L. vannamei</i> | Total | Subproductos de hacha. | Mayor crecimiento y supervivencia. |
| Toyes-Vargas <i>et al.</i> (2017) <i>L. vannamei</i> | Total | Harina de vísceras de calamar, harina de vísceras de callo de hacha, harina de macarela. | Supervivencia alta en camarones alimentados con los con subproductos, en camarones con alimento comercial mejor supervivencia. |
| Sabry-Neto <i>et al.</i> (2017) <i>L. vannamei</i> | Parcial | Harina de krill (0, 10,20 y 30%) en alimentos hechos con plantas. | El alimento al 10% de harina de krill incrementó el alimento consumido, mientras que el de 20% y 30% aumentaron la ganancia de peso y redujo el factor de conversión alimenticia. Mayor ganancia de peso con alimentos con harina de krill y cabezas de camarón. |
| Nunes <i>et al.</i> (2019) <i>L. vannamei</i> | Parcial | Harina de cabezas de camarón, harina de krill, harina de hígado de calamar agregadas al 3% en alimentos con harina de pescado. | |

2.2 Estrés en crustáceos

Todos los organismos vivos mantienen un equilibrio dinámico u homeostasis, que es constantemente desafiado por efectos adversos internos y externos denominados estresores. El estrés se define como el estado en el cual la homeóstasis se ve amenazada (Chrousos, 2009). La respuesta de estrés es iniciada por el organismo casi inmediatamente después de la percepción del estresor (Schreck y Tort, 2016) y pasa a través de tres fases: la primera fase es una reacción de alarma, usualmente caracterizada por una respuesta fisiológica rápida y una reacción de huida; en la segunda fase se da un estado de resistencia; durante la tercera fase de larga duración, el organismo se adapta o compensa las condiciones alteradas causadas por el estrés con el propósito de recuperar su homeostasis: en caso de que esta compensación no pueda ser posible, el organismo entra en agotamiento y/o muerte (Barton e Iwama 1991). Por otro lado, los estímulos estresores se pueden clasificar de acuerdo con su duración, si este dura un corto tiempo o puntual (minutos, horas) se considera un estrés del tipo agudo y si este es de forma prolongada (días o semanas) se considera estrés del tipo crónico (Eissa y Wang, 2016). El estrés agudo por manejo es uno de los estresores más comunes en los sistemas de cultivo de camarón, cuando los camarones vivos son removidos del agua usando atarrayas, lo cual implica que traten de escapar de la red y se active el metabolismo anaerobio, disminuyendo el adenosín trifosfato (ATP por sus siglas en inglés) (Robles-Romo *et al.*, 2016; Zamora-Méndez *et al.*, 2017). Posteriormente, durante el transporte entre estanques los camarones usualmente sufren exposición al aire, disturbios mecánicos y cambios en los factores ambientales (Liu *et al.*, 2014).

La exposición al aire es uno de los estresores más severos para los crustáceos, este tipo de estrés deja en desbalance la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sang y Fotedar, 2005; Zenteno-Savín *et al.*, 2006; Parrilla-Taylor y Zenteno-Savín, 2011; Duan *et al.*, 2016a; Xu *et al.*, 2018). Los ROS incluyen radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, hidroxil, alcoholil y radicales peroxil que pueden reaccionar y dañar los componentes celulares como proteínas, carbohidratos y lípidos, llevando a alteraciones en la homeostasis (Bowler *et al.*, 1994). En la Tabla III se enlistan algunos estudios donde se

somete a estrés por manejo, incluyendo exposición al aire, donde se hace referencia a los efectos adversos.

Tabla III. Estudios en camarones sometidos a estrés por manipulación o exposición aérea.

| Referencia | Organismo | Tipo de estrés | Resultado |
|------------------------------|---|---|---|
| Sang y Fodetar (2005) | <i>Penaeus sculentus</i> y <i>P. latisulcatus</i> | Exposición aérea de 14 a 20 minutos. | Se observó menor capacidad osmorregulatoria que camarones expuestos 7 minutos al aire. |
| Mercier et al. (2006) | <i>L. vannamei</i> | Manejo repetido inducido, 4 semanas. | Una respuesta metabólica disminuida en camarones estresados. |
| Aparicio-Simón et al. (2010) | <i>L. vannamei</i> | Persecución, confinamiento y transferencia. | Niveles de lactato y glucosa elevados a los 30 minutos. |
| Liu et al. (2014) | <i>L. vannamei</i> | Exposición aérea de 10 a 20 minutos. | Cambios en los niveles de superóxido dismutasa, malondialdéhido (en músculo y hepatopáncreas). |
| Duan et al. (2016a) | <i>Marsupenaeus japonicus</i> | Exposición aérea de 3 a 10 horas. | 3 horas es suficiente para afectar significativamente la supervivencia y modifica la respuesta oxidativa del hepatopáncreas, producción de ROS sobre-reguladas, GPx y MDA actividad reducida. |
| Duan et al. (2016b) | <i>Penaeus monodon</i> | 0.5 a 3 horas de estrés por desecación | Modificación de las actividades de las enzimas antioxidantes, la producción de ROS y MDA en el hepatopáncreas, concluyen que la exposición al aire debe hacerse no más de 30 min. |
| Xu et al. (2018) | <i>L. vannamei</i> | Exposición aérea en transportación sin agua. | Hepatopáncreas es más susceptible al estrés según los resultados que obtuvieron en SOD, GPx, MDA. |
| Xu et al. (2019) | <i>L. vannamei</i> | Temperatura baja y exposición aérea durante transportación (13°C por 3 minutos y 15°C por 12 h) y re- sumergidos al agua. | Actividad enzimática de fenol oxidasa, lisozimas y gama-glutamil transferasa, expresión de genes profenoloxidasa, ferrin y proteína reguladora de glucosa incrementaron a un máximo nivel a las 3-9 h de exposición al aire. |
| Wang et al. (2020) | <i>M. japonicus</i> | Exposición aérea por 2.5, 5, 7.5, 10 y 12.5 h. | Expresión de genes de apoptosis y genes de hipoxia de forma dramática en hepatopáncreas y branquias, el estrés indujo a la apoptosis en hepatopáncreas y branquias comparados con el grupo control a las 12.5 h. Metilación de ADN reducida en grupos estresados. |

Tabla IV. Estudios en camarones sometidos a estrés por manipulación y por exposición aérea y su efecto sobre expresión de enzimas antioxidantes y actividad de enzimas

| Referencia | Organismo | Tipo de estrés agudo | Resultado |
|--------------------------------------|------------------------|---|---|
| Wang <i>et al.</i> (2009) | <i>L. vannamei</i> | Disminución y aumento de pH. | Incremento de ROS en hemocitos, la expresión de genes CAT, GPx y TRx, daño en ADN, iones calcio como mediadores de respuesta ante el estrés por pH de 9.3 y 5.6 a las 12 horas. |
| Zhou <i>et al.</i> (2010) | <i>L. vannamei</i> | Estrés térmico de 15, 22 y 28 °C. | El estrés térmico indujo a la expresión de genes SOD, CAT, GST, ferritina y HSP60 en branquias y hemocitos, GST se sobre expresó en hemocitos a 22°C y 28°C. |
| Qian <i>et al.</i> (2012) | <i>L. vannamei</i> | Estrés térmico y de pH. pH de 6.1, 7.1, 8.1, 9.1, 10.1. Cambio de temperatura de 36 a 27°C. | Estrés térmico: expresión diferencial de genes de proteína de choque térmico, la expresión de los genes dependió del pH y del tiempo de este estrés donde la proteína HPS60 es la más afectada. |
| Trasviña-Arenas <i>et al.</i> (2013) | <i>L. vannamei</i> | Hipoxia: 1.5 mg/L y 6 mg/L de O ₂ por 24 h y re-oxigenación por 1 h. | Expresión de CAT en branquias incrementó 3.2 y 3 en respuesta a hipoxia y re-oxigenación (6 y 24 h) comparados con normoxia, no se encontraron diferencias de expresión en hepatopáncreas. |
| Liu <i>et al.</i> (2014) | <i>L. vannamei</i> | Exposición aérea de 10 a 20 minutos. | Cambios en los niveles de SOD, MDA en músculo y hepatopáncreas. |
| Li <i>et al.</i> (2016) | <i>L. vannamei</i> | Hipoxia aguda, 6.5, 3.0 y 15 ppm por 24 horas. | Se observaron cambios en la actividad de SOD, GPx y MDA, daño en ADN en branquias, hepatopáncreas y hemolinfa. |
| Duan <i>et al.</i> (2016b) | <i>Penaeus monodon</i> | Exposición aérea de 0.5 a 3 horas. | Modificación de las actividades de las enzimas antioxidantes, la producción de ROS y MDA en el hepatopáncreas, concluyen que la exposición aérea debe hacerse no más de 30 min. |
| Shi <i>et al.</i> (2016) | <i>Penaeus monodon</i> | pH 7.0 y 9.0, estrés osmótico 2.3 y 4.3‰ y exposición a metales pesados Cu, Zn y Cd. | Se detectó expresión de las enzimas HSP10 y HSP60 en hepatopáncreas y branquias en todos los tipos de estrés aplicados |
| Xu <i>et al.</i> (2018) | <i>L. vannamei</i> | Expuestos al aire en transportación sin agua. | Hepatopáncreas es más susceptible al estrés según los resultados que obtuvieron en SOD, GPx, MDA. |

La producción de ROS puede ser neutralizada, prevenida o retrasada a través de defensas antioxidantes que incluyen enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, pero también por otras proteínas secuestradoras de metales, glutatión, cisteína, así como por vitaminas y pigmentos que actúan como antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Se ha reportado en varios estudios con camarones que las enzimas antioxidantes tienen un efecto importante ante un estrés (Tabla IV) (Bowler *et al.*, 1994; Benzie, 2000; Halliwell, 2011).

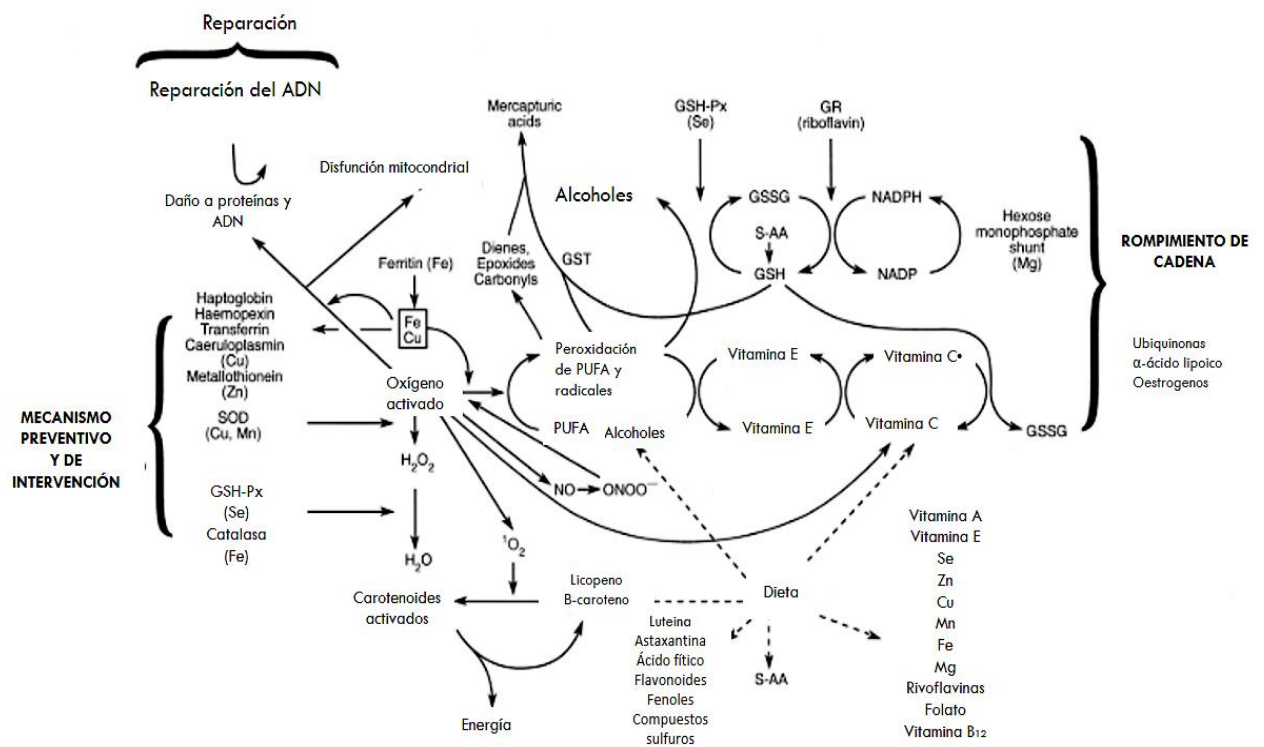


Figura 1. Sistemas de defensas antioxidantes (adaptado de Benzie, 2000).

2.3 Antioxidantes y HUFA

La generación continua de ROS, a los cuales se les conoce comúnmente como pro-oxidantes, es un fenómeno característico en la vida normal aerobia. Bajo condiciones normales los ROS son neutralizados por las defensas antioxidantes de los organismos,

mientras que cuando hay una alteración en el equilibrio entre los pro-oxidantes y antioxidantes resulta en un estrés oxidativo (Dandapat *et al.*, 2000). Las evidencias indican que la salud de los organismos acuáticos se encuentra comprometida con la sobre producción de ROS en sus tejidos, y el efecto protector contra estos radicales concierne tanto a los antioxidantes endógenos como exógenos. La inclusión de antioxidantes naturales como carotenoides, péptidos, compuestos fenólicos, vitaminas E y C, o ingredientes ricos en compuestos bioactivos o pigmentos (algas marinas, subproductos de pesquerías) en los alimentos experimentales, además de ácidos grasos HUFA n-3, tienen efectos positivos sobre el desempeño de los camarones (Palacios *et al.*, 2005; Ngo *et al.*, 2011; Jomova *et al.*, 2013; Mutti *et al.*, 2017). En bioensayos nutricionales con camarón, se ha observado mayor ganancia de peso y supervivencia en camarones *P. monodon* con un alimento con 0.1% de astaxantina y 1% de colesterol, a diferencia de alimento con 0.25% de β -caroteno o control (Niu *et al.*, 2014).

Los carotenoides son derivados de compuestos isoprenoides liposolubles, que solo pueden ser sintetizados por microorganismos, hongos, algas y plantas superiores; se caracterizan por un sistema π -electrón muy importante debido a que estabiliza los electrones impares de los radicales libres, son moléculas fuertes atraparoras de oxígeno singlete y peroxiradicales, son protectores importantes de la membrana celular al encontrarse en la interfase lípido-agua y comúnmente se encuentran asociados a proteínas o lipoproteínas (Figura 2) (Kaulmann *et al.*, 2014).

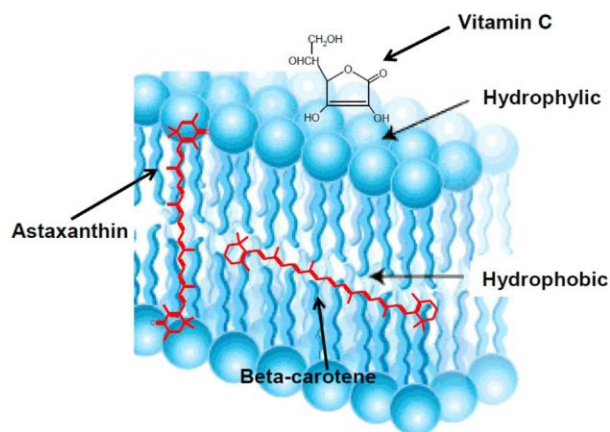


Figura 2. Localización de los carotenoides en las membranas biológicas (Jomova *et al.*, 2013).

Los carotenoides tienen un papel muy importante como antioxidantes al inactivar radicales libres producidos a partir de la actividad celular normal y distintos factores de estrés (Chien *et al.*, 2003). La astaxantina es el antioxidante más poderoso que se conoce en la naturaleza, es 100 veces mejor que el tocoferol, también tiene una actividad fuerte como inhibidor de peroxidación de lípidos mediada (Chien *et al.*, 2003). En crustáceos los carotenoides pueden estar en forma libre o esterificados a algunas moléculas como las proteínas formando carotenoproteínas. Las carotenoproteínas son de color azul-grisáceo en camarones vivos, pero al liberarse el carotenoide cuando los camarones son cocidos, producen un color naranja-rosado típico (Hernández-Becerra *et al.*, 2014). Se ha propuesto que las propiedades antioxidantes están relacionadas con la resistencia al estrés (Regunathan y Wesley, 2006), evidenciado por correlaciones entre la concentración de pigmentos en el tejido y la supervivencia de *Marsupenaeus japonicus* (Thongrod *et al.*, 1995). También se ha encontrado que en postlarvas de camarón tigre (*P. monodon*) se incrementa la supervivencia durante cultivo (Darachai *et al.*, 1998) o ante un estrés (Merchie *et al.*, 1998) cuando la dieta es suplementada con astaxantina. Niu *et al.*, 2014 observaron que el alimento suplementado con astaxantina y colesterol ayudó a que se absorbiera mejor la astaxantina y después de aplicar un reto de estrés de 36 h donde se simuló la transportación, los tratamientos suplementados con astaxantina presentaron mayor supervivencia. Huang *et al.* (2008) dieron cinco alimentos con calamar a *P. monodon*, y aquellos camarones donde el alimento además fue complementado con diferentes cantidades de HUFA y astaxantina tuvieron mejor rendimiento reproductivo, mayor porcentaje de desoves, menor latencia y mayor producción de huevos, donde la composición de ácidos grasos afectó los tejidos y la fecundidad de los reproductores, que en sí mismo es otro tipo de estrés.

2.4 Ácidos grasos y su oxidación

La estructura general de un ácido graso es una cadena hidrocarbonada con un grupo carboxilo en un extremo. Los ácidos grasos más abundantes tienen cadenas rectas de un

número par de átomos de carbono y las longitudes de cadena varían de 2 a 30 o más, con cero, uno o más de dos dobles enlaces (Calder, 2005). Los ácidos grasos insaturados se describen por la longitud de su cadena, el número y la localización de sus enlaces dobles. Los ácidos grasos polinsaturados (PUFA) son definidos como ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces. Los PUFA pueden ser subdivididos en dos importantes grupos, ácidos grasos omega 6 y omega 3, estos tienen distintas rutas de biosíntesis y funciones (Tocher, 2003).

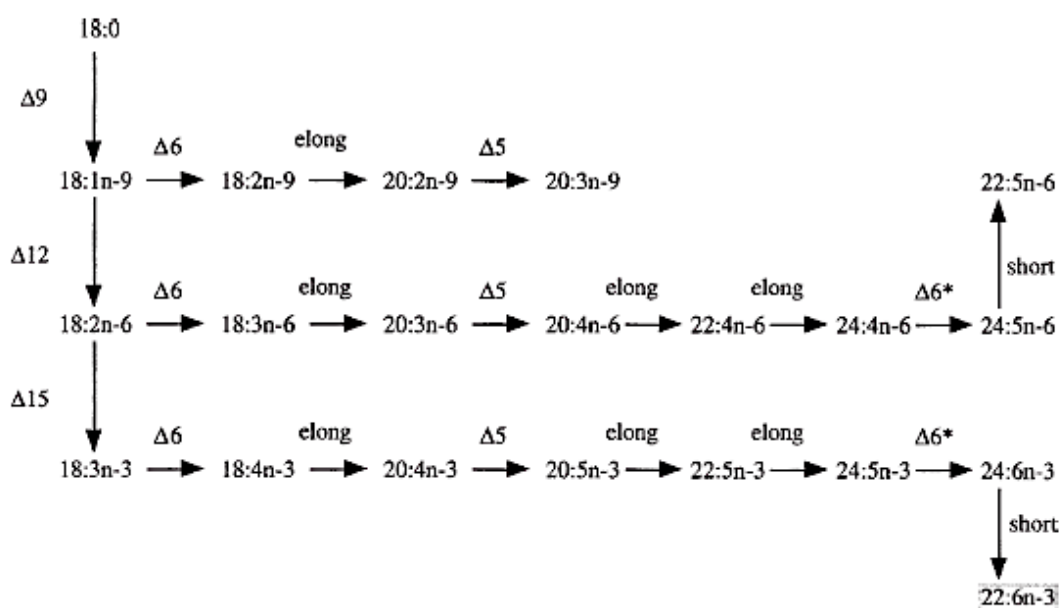


Figura 3. Ruta de biosíntesis de HUFA C₂₀ y C₂₂ a partir de los precursores n-3, n-6 y n-9 C₁₈. Δ5, Δ6, Δ6 *, Δ9, Δ12, Δ15, desaturasas; elongasas. Δ9 desaturasa se encuentra en todos los animales y plantas, mientras que Δ12 y Δ15 desaturasas generalmente solo se encuentran en plantas. La enzima Δ6 * que actúa sobre los ácidos grasos C₂₄ puede o no ser la misma enzima (Δ6) que actúa sobre los ácidos grasos C₁₈ (Tocher, 2003).

La mayoría de los vertebrados e invertebrados, carecen de las enzimas desaturasas Δ12 y Δ15 por lo que no pueden formar 18:2n-6 y 18:3n-3 a partir de 18:1n-9, siendo estos ácidos grasos esenciales para los animales, mientras que las plantas sí los sintetizan (Bell y Tocher, 2009). A partir de 18:2n-6 y 18:3n-3 puede haber desaturación y elongación para formar ácidos grasos de 20 y 22 carbonos o HUFA, como el ácido araquidónico (20:4n-6,

ARA), eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) (Figura 3). El grado a través del cual puede llevarse a cabo la conversión en cada especie depende de la actividad de las elongasas y desaturasas, como $\Delta 6$ y $\Delta 5$ (Tocher, 2003). Algunos animales pueden sintetizar HUFA a partir de los PUFA 18:3n-3 y 18:2n-6., pero otros, como los peces marinos y los crustáceos, no pueden sintetizar HUFA a partir de estos PUFA (Figura 4), por lo cual los HUFA tales como ARA, EPA y DHA se consideran esenciales para el camarón (González-Félix y Pérez-Velázquez, 2002).

Los HUFA son precursores de PG y otros compuestos biolipídicos y forman parte de lípidos estructurales, como los fosfolípidos, que tienen funciones importantes en la integridad de la membrana celular y algunos también pueden tener una función biolipídica. Por tener varios dobles enlaces, los HUFA son muy propensos a la oxidación. La oxidación lipídica (peroxidación) ocurre a través de una reacción directa de los lípidos con el oxígeno catalizado por radicales libres: los ROS reaccionan con los dobles enlaces de los HUFA, generando radicales de lípidos inestables que pueden resultar en un daño en las membranas y organelos celulares (Halliwell y Gutteridge, 1996). Entonces, cuando cualquier especie con reactividad suficiente para atacar una cadena de algún PUFA, extrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-) resulta una cadena de peroxidaciones, la peroxidación da lugar a la formación de una gran cantidad de productos (Gutteridge, 1995). La peroxidación particular de ARA produce como resultado la formación de isoprostanos (IsoP), los cuales son compuestos similares a las PG. En contraste de los PG derivados a partir de la COX, que son generados a partir de ARA libre, los IsoP se forman por la peroxidación del ARA *in situ* esterificado a fosfolípidos por medio de la vía no enzimática, el cual es liberado posteriormente por la fosfolipasa (Milne *et al.*, 2015). La formación de IsoP-F₂ por el ARA se produce después de la substracción de un átomo de hidrógeno bisalélico, y la adición de oxígeno molecular (O₂) al ARA para formar un radical peroxilo; el radical peroxilo sufre una ciclación 5-exo y una segunda molécula de O₂ se agrega a la estructura principal del compuesto, para formar compuestos similares a PGG₂, siendo estos los intermediarios que se reducen a IsoP-F₂, siguiendo este mecanismo se forman cuatro isómeros, cada uno de los cuales produce ocho diasteroisómeros, para ser un total de 64 compuestos generados (Figura 5) (Milne *et al.*, 2015). Los PUFA como ALA

(ácido linolénico), EPA, AdA (ácido adrénico) y DHA tienen al menos dos unidades de dieno omitido: es decir, tres unidades consecutivas interrumpidas con metileno, que pueden formar estructuras similares a isoprostanos (Galano *et al.*, 2015).

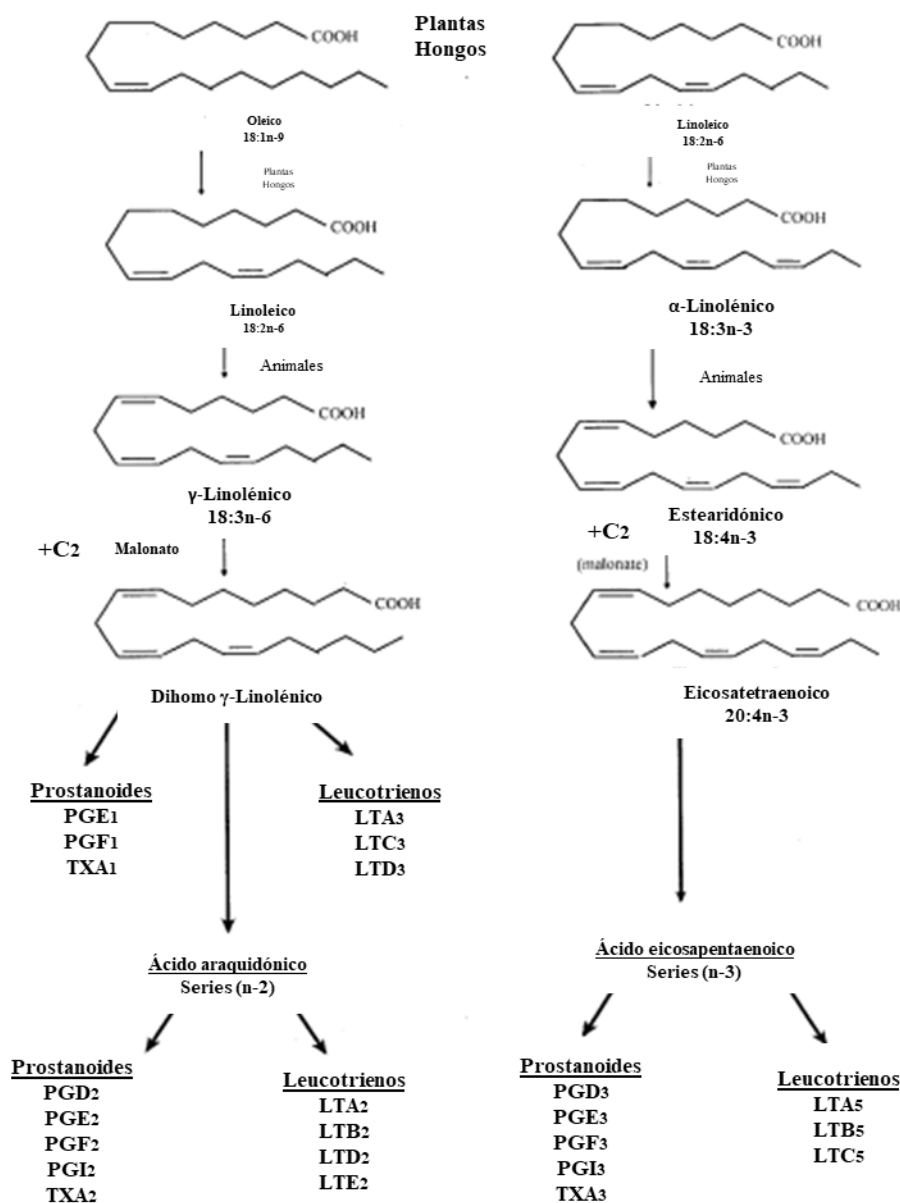


Figura 4. Rutas de síntesis de eicosanoides a partir de ARA (serie 2) y EPA (serie 3) (Tapiero *et al.*, 2002).

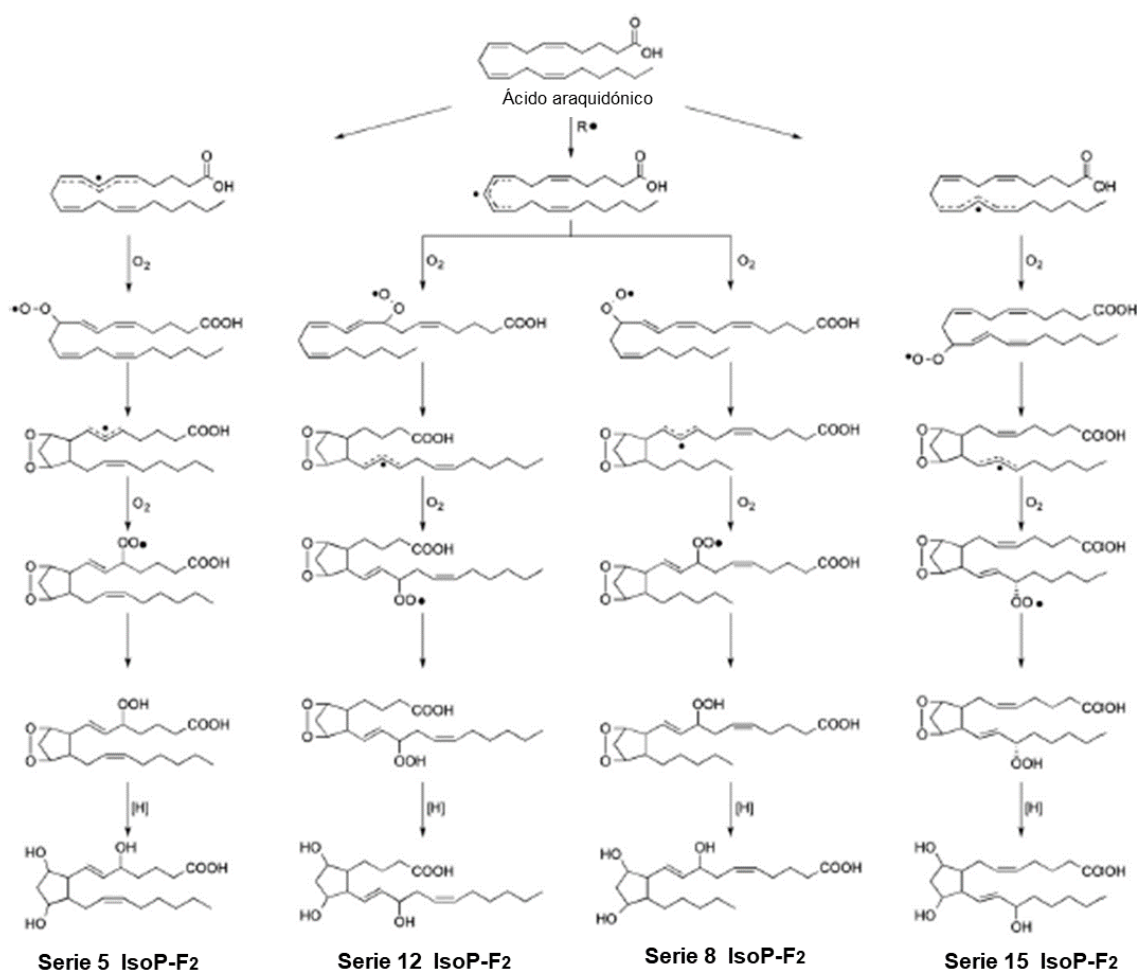


Figura 5. Mecanismo de producción de isoprostanos-F₂ a partir de la peroxidación de ARA catalizado por radicales libres (Milne *et al.*, 2015).

Cuando estos compuestos se encuentran en altas concentraciones en su forma libre afectan la integridad de la membrana celular y, consecuentemente, la de los tejidos adyacentes, causando un estado de daño oxidativo *in vivo*, donde los IsoP, principalmente el 8-IsoP tiene efectos vasoconstrictivos en una gran variedad de órganos como riñones, cerebro, pulmones y arterias pulmonares (Basu, 2008). En el cerebro un aumento en la oxidación de lípidos produce un daño oxidativo con evidencia de niveles altos de ciertas proteínas, IsoP y IsoPF₄ (Butterfield y Halliwell, 2019). En el útero, la hipoxia neonatal, preclamsia, hiperglicemia o infecciones pueden provocar estrés oxidativo perinatal y con

ello la secreción de IsoP siendo estos marcadores de estrés (Torres-Cuevas *et al.*, 2017). El nivel de IsoPF₂ también ha sido relacionado con enfermedades como diabetes (Mori *et al.*, 1999).

2.5 Ciclooxygenasas y prostaglandinas

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima presente en casi todas las células animales y vegetales. Tiene varias isoformas, entre las más importantes las llamadas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), que son similares en estructura y actividad catalítica, pero tienen una importante diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región promotora. La región promotora de del gen de COX-1 carece de caja TATA, en contraste con el gen de COX-2 que tiene múltiples secuencias regulatorias transcripcionales incluyendo la caja TATA, y se activan bajo condiciones fisiológicas distintas (Park *et al.*, 2006). Las COX catalizan los pasos de la síntesis de PG, prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TX); estas funciones ocurren en dos sitios distintos interrelacionados, el paso de oxigenación ocurre en el canal de la molécula de COX, mientras que el paso de reducción ocurre en el grupo hemo de la superficie de la molécula. El sitio activo de la COX-2 es más largo, donde se reemplaza la isoleucina-434 de la COX-1 por valina-434 (Figura 6), estas diferencias en el sitio activo permiten el desarrollo de inhibidores específicos de COX-2 (Park *et al.*, 2006; Orlando *et al.*, 2015). Las COX identificadas en invertebrados marinos comparten al menos el 50% de aminoácidos con las COX-1 y COX-2 de los vertebrados (Varvas *et al.*, 2009).

La función de la COX-1 es la de mantener la tasa basal de síntesis de prostanoïdes. Dos ejemplos de COX-1, dependientes del metabolismo de ARA a niveles altos (>10 µM), son la síntesis constitutiva de PGE₂ (prostaglandinas de la serie E₂) por el sistema gastrointestinal para mantener la homeostasis (secreción de ácido gástrico), y la generación de TXA₂ por la activación de plaquetas. En contraste la COX-2 tiene una función inductiva que genera la producción de prostanoïdes en niveles bajos (<2.5 µM) a partir de ARA, en respuesta a estímulos inflamatorios. La COX-2 se expresa constitutivamente y contribuye a

la continua generación vasoprotectiva en las células (Tapiero *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2006; Patrignani y Patrono, 2015).

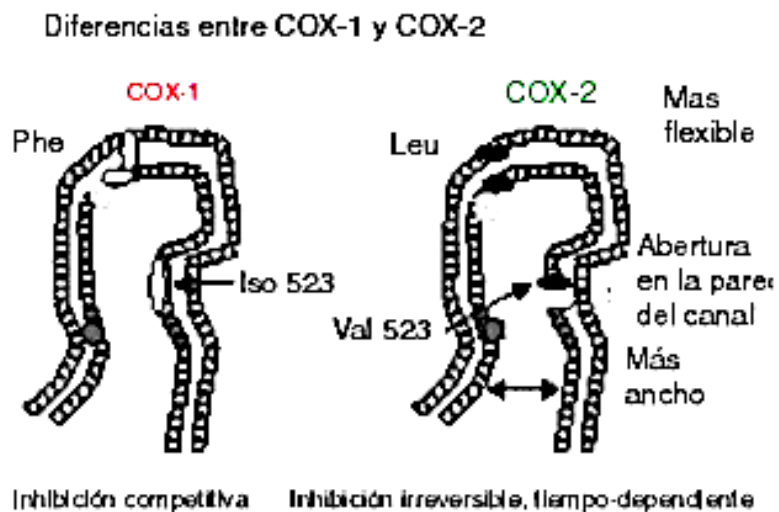


Figura 6. Diferencias estructurales de COX-1 y COX-2 en humanos (Hawkey, 1999).

El ARA y el EPA son sustratos tanto para COX como para enzimas lipoxigenasas (5, 12-, 15-) y dan lugar a la formación de sus respectivos productos. Por lo tanto, ARA es el precursor para la formación de PG de la serie 2 (como PGA_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2), tromboxanos (como TXA_2) y leucotrienos de la serie 4 (como LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 , LTE_4). Por otro lado, el EPA es el precursor de PG de la serie 3 y de Tx de las series 3 y 5; estos productos son menos proinflamatorios en comparación con los productos generados a partir de ARA (Stanley y Miller, 2006; Poorani *et al.*, 2016). El ARA en la membrana celular de los fosfolípidos puede ser movilizado por la fosfolipasa A_2 y después el ARA actúa como un sustrato de COX donde se sintetizan PG y otros eicosanoides, por medio de otra enzima, la lipooxigenasa (LOX) (Figura 7). Los principales eicosanoides producidos por LOX son los ácidos epoxieicosatrienoicos y leucotrienos, entre otros.

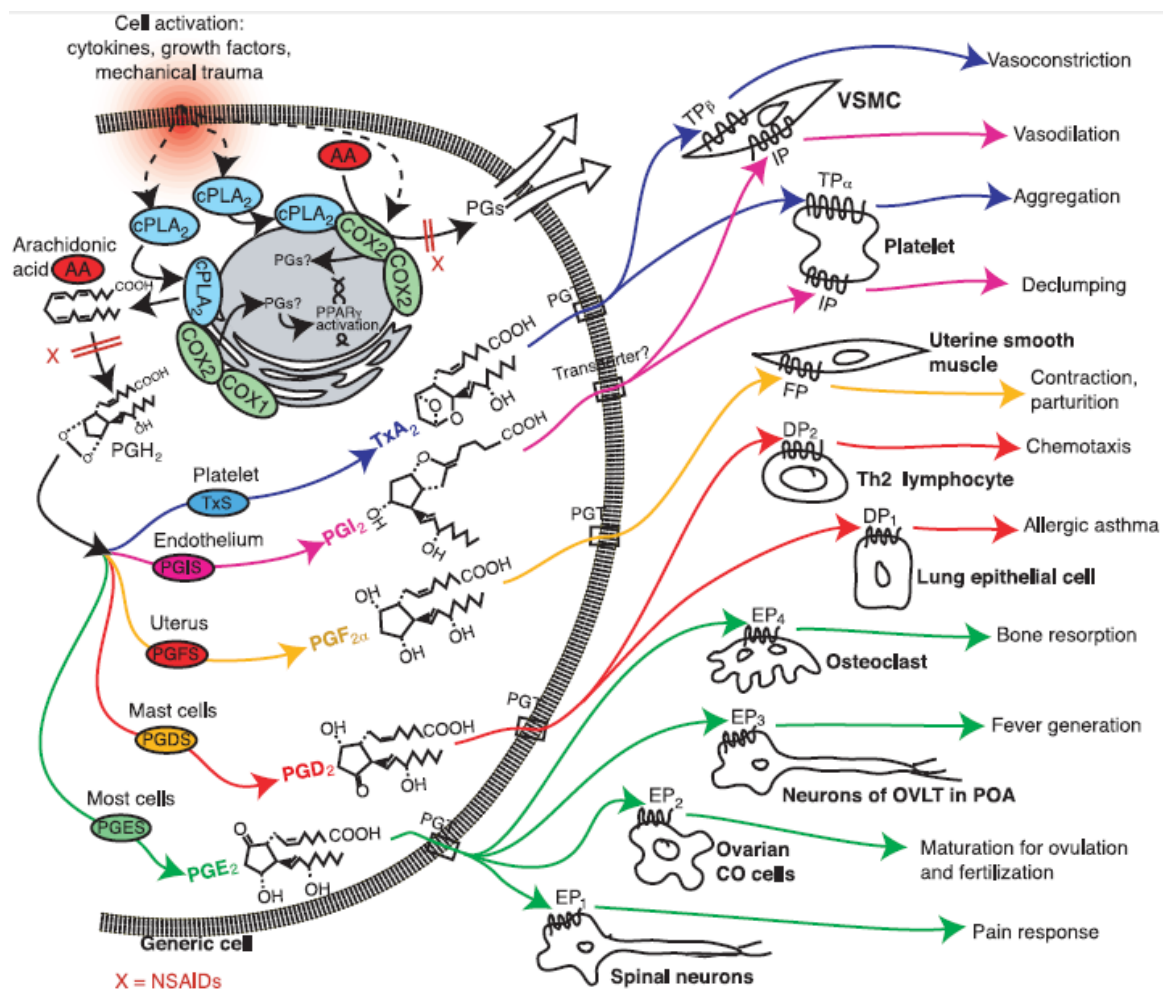


Figura 7. Síntesis de diferentes prostaglandinas en distintos tejidos (Funk, 2001).

El ácido acetilsalicílico (ASA) bloquea el sitio activo de la conversión de ácido araquidónico a PG, por lo que se ha postulado que el ASA inhibe la enzima ciclooxigenasa por competencia con el sustrato por el sitio activo, cuya reacción es irreversible (Roth *et al.*, 1975). La acción de ASA sobre la COX se basa en la transferencia del grupo acetilo de ASA a un grupo hidroxilo de un aminoácido (serina 529 en COX-1 y serina 516 en COX-2) en el sitio activo de la enzima (Figura 8). Este es una reacción de esterificación, por lo que el enlace formado es covalente. Esto significa que la inhibición es irreversible (Vane y Botting, 2003; Fitzgerald y FitzGerald, 2013). El ASA también induce a la síntesis de una clase de mediadores lipídicos anti-inflamatorios conocidos como resolvinas y protectinas.

Estos derivados de EPA y DHA inmunomoduladores se denominan mediadores pro-resolventes especializados (SPM por sus siglas en inglés). El EPA se convierte en resolvina E₁ y E₂ por la 5-lipoxigenasa (LOX) y resolvina E₃ por 15-LOX. El DHA se convierte en resolvina D₁ por la COX-2 / aspirina / 15-LOX y 5-LOX promueve, protectina D₁ por COX-2 / aspirina / 15-LOX y maresina 1 (Figura 9) (Serhan y Chiang, 2004). Los patólogos dividen la respuesta inflamatoria aguda en iniciación y resolución. La resolución se consideró un proceso pasivo. Con la identificación de mediadores con capacidad de resolución que podrían ser biosintetizados a partir de ácidos grasos esenciales (EFA) omega-3, surgió evidencia de que la resolución de la inflamación aguda autolimitada podría ser una respuesta activa y programada que es “activada” en modelos animales (Poorani *et al*, 2015).

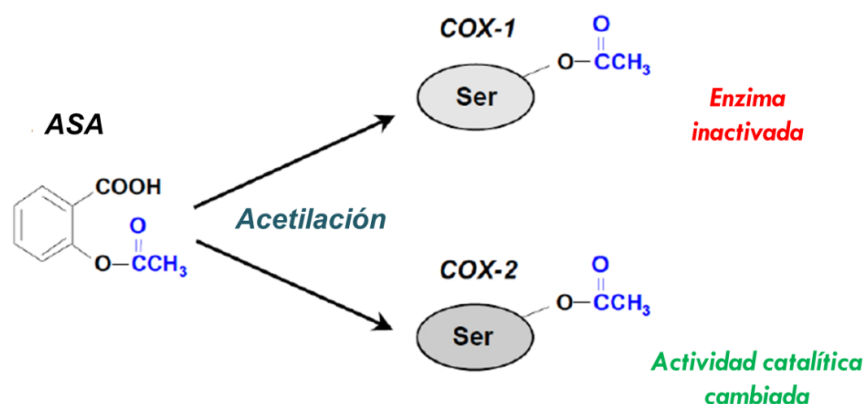


Figura 8. Mecanismo de acción de ASA, acetilación de COX, el ASA acetila el residuo de serina (Ser) de la COX, e inactiva de forma irreversible la COX-1, en el caso de la COX-2, el ASA “inactiva” la habilidad de generar PG, pero “activa” la capacidad de producir SPM (figura tomada y adaptada de Chiang y Serhan, 2004).

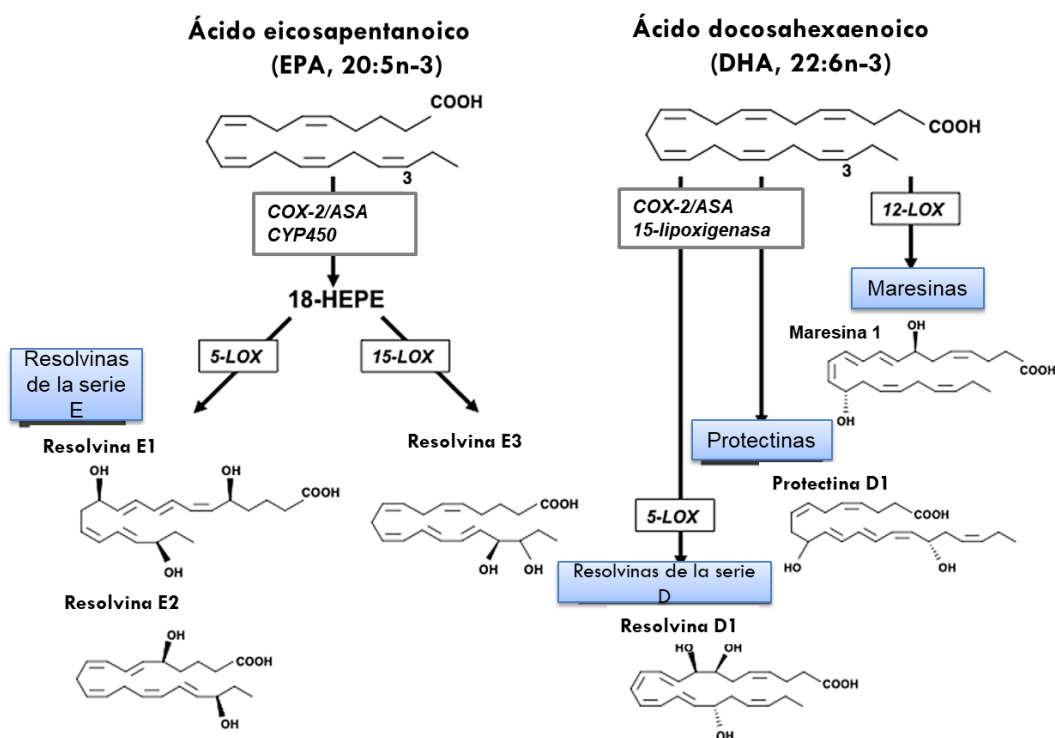


Figura 9. Ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y mediadores lipídicos específicos de resolución previa. (figura tomada y adaptada de Ueno *et al.*, 2019).

Se han reportado PG y otros eicosanoides en varios invertebrados marinos como corales, crustáceos, moluscos, cnidarios, esponjas, anélidos y cordados (Varvas *et al.*, 1994; Varvas *et al.*, 2009), pero se desconoce su modo de acción y enzimas involucradas (Varvas *et al.*, 2009). La ruta de biosíntesis de PG fue reportada por primera vez en invertebrados en el coral blando *Gersemia fruticosa* (Rowley, 2005). En invertebrados acuáticos (Tabla V), las PG han sido implicadas en varias funciones como regulación de iones, espermatogénesis, ovogénesis y defensa inmune (Rowley, 2005; Eades y Waring, 2010). Tadasi y Hiroshi (1976) determinaron la cantidad de PGE_2 en varios tejidos de invertebrados marinos, encontrando señal en calamar, moluscos, ostiones, langostinos, cangrejo azul y anemonas. Tahara y Yano (2004) determinaron una relación entre la concentración de PGE_2 y el estado de vitelogénesis en *Marsopeneus japonicus*, encontrando la concentración más alta (15 pg/mg de PGE_2) en el estadio I de vitelogénesis en hembras.

Tabla V. Estudios en invertebrados marinos donde se analizan diversas prostaglandinas.

| Referencia | Organismo | Especie | Tejido | Cantidad de muestra | PG analizado | PG |
|---|----------------|----------------------------------|---|--|--|------------------|
| Tadasi y Hiroshi, 1976 | Calamar | <i>Halocynthia roretzi</i> | Ovarios | N/D | PGE ₂ | 2 pg/mg ww |
| | | | Músculo | N/D | PGE ₂ | 1 pg/mg ww |
| | Molusco | <i>Mytilus edulis</i> | Gónadas | N/D | PGE ₂ | 6 pg/mg ww |
| | | | Branquias | N/D | PGE ₂ | 8 pg/mg ww |
| | | | Manto | N/D | PGE ₂ | 12 pg/mg ww |
| | Ostión | <i>Patinopecten yessoensis</i> | Branquias | N/D | PGE ₂ | 4 pg/mg ww |
| | | | Músculo | N/D | PGE ₂ | 2 pg/mg ww |
| | Langostino | <i>Cambarus clarki</i> | Hepatopáncreas | N/D | PGE ₂ | 4 pg/mg ww |
| | | | Branquias | N/D | PGE ₂ | 45 pg/mg ww |
| | | | Cangrejo azul | <i>Portunus trituberculatus</i> | N/D | PGE ₂ |
| Osada y Nomura 1990 | Ostión | <i>Patinopecten yessoensis</i> | Ovarios | 1 g | PGE ₂ | 15 pg/mg ww |
| | | | Larvas | 1000 organismos | PGE ₂ , PGF ₂ , TBX | 57.2 pg/mg ww |
| Tahara y Yano, 2004 Reddy <i>et al.</i> , 2004 | Camarón tigre | <i>M. japonicus</i> | Ovarios | completo | PGE ₂ | 15 pg/mg ww |
| | Cangrejo | <i>Oziotelphusa senex</i> | Inyección de PG (F ₂ y E ₂) en ovarios | N/D | Actividad de PGH sintasa, PGF ₂ , PGD ₂ y PGE ₂ | PGEM |
| Aguilar <i>et al.</i> 2012 | Camarón blanco | <i>L. vannamei</i> | Hemolinfa | 0.25 (ml) | PGEM | 600 pg/ml |
| Wimuttisuk <i>et al.</i> 2013 | Camarón café | <i>Penaeus monodon</i> | Ovarios | N/D identificación de genes y en HPLC | PGF ₂ y PGF ₂ α | N/D |
| Sumpownon <i>et al.</i> 2015 | | <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | Ovarios | N/D | PGE ₂ , COX1 | N/D |
| Corrales-Rosales <i>et al.</i> , 2020 | Camarón blanco | <i>L. vannamei</i> | Espermatóforos | 20 mg | PGEM | 1.2-1.4 ng/mg ww |

N/D: No descrito.

2.6 Esteroles y su oxidación

La peroxidación se centra en la oxidación de los PUFA, debido a la facilidad con la que se da la formación de radicales libres y por estar altamente expuestos al ser parte de la membrana celular y mitocondrial. Sin embargo, también el colesterol que se encuentra en la membrana celular puede oxidarse en la presencia de oxígeno produciendo oxicolesterol o comúnmente llamados COP (por sus siglas en inglés), y al igual que los ácidos grasos oxidados, pueden generarse por autooxidación y oxidación enzimática (Kulig *et al.*, 2016). Los tipos y concentraciones de COP producidos dependerá del origen del mecanismo de oxidación, como condiciones ambientales (temperatura, luz) y presencia de elementos traza y biomoléculas con actividades prooxidantes y antioxidantes (Cardenia *et al.*, 2013). La oxidación tiene un mecanismo similar al de los ácidos grasos insaturados, con un doble enlace entre el carbono 5 y 6, el enlace simple del carbono 4 y 5, y 6 y 7 son más susceptibles al ataque de radicales libres de oxidación de lípidos y de especies reactivas de oxígeno (Dinh y Thompson, 2016).

Los COP tienen la misma estructura que el colesterol, pero poseen más grupos funcionales que contienen oxígeno, localizados en los carbonos 5, 6 ó 7. La oxidación inicia con la substracción del oxígeno del carbono 7 por el radical libre, creando un radical libre en los anillos estructurales del colesterol, la migración de este radical libre y la subsecuente formación de hidroperóxido, hidroxil o cetona ocurren en el carbono 7. Especies reactivas de oxígeno como oxígeno triplete pueden atacar en el doble enlace 5-6, para formar 5,6 epoxicolesterol que puede ser hidratado para formar triol. La degradación de hidroperóxido C7, formas de radical hidroxilo y 7-alcoxi radical se vuelven 7-hidroxycolesterol a través de la abstracción del hidrógeno, o la formación de 7-quetocolesterol. Además, futuras deshidrataciones del colesterol pueden promover a la formación de colest-3,5 dien conjugado, 7-quetocolesterol, colest-3,5 dien-7-uno y colest-3, 5, 7-trien. Colesterol 7-hidroxi-peróxido y radicales libres intermedios propagan nuevos radicales libres de otro colesterol o ácidos grasos insaturados (Figura 10) (Dinh y Thompson, 2016).

Los COP se encuentran involucrados en varias enfermedades degenerativas y crónicas, funcionalidad de la célula, metabolismo de lípidos, y muestran efectos citotóxicos (en macrófagos, fibroblastos, células vasculares, y células cancerígenas), apoptóticos y efectos pro-inflamatorios (Schroepfer, 2000; García-Cruset *et al.*, 2002; Guardiola, 2002; Otaegui-Arrezola *et al.*, 2010). Los COP provocan un desbalance en la relación entre reacciones oxidativas y reductivas (estrés oxidativo), que actúan en todos los niveles, desde la señalización celular hasta expresión en enfermedades. El 25 α -hidrocolesterol (25OHC) es uno de los oxicolesteroles más dañinos en la arterosclerosis, dado que promueve la producción de PG desde el ARA. El 25OHC ha sido encontrado en placas de ateromas y en el tejido aórtico, interrumpe la función de barrera de las células endoteliales y modula una serie de pasos implicados en el metabolismo de colesterol. Wohlfeil y Campbell (1997) probaron la hipótesis de que los COP alteran la producción de eicosanoides en células vasculares del endotelio de bovinos; sus datos mostraron que la estimulación ocurre vía inducción de PG del tipo GrH sintasa-2 (PGHS-2). La PGHS-ciclooxigenasa es una enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de PG, es decir, la conversión de ácido araquidónico en PGH.

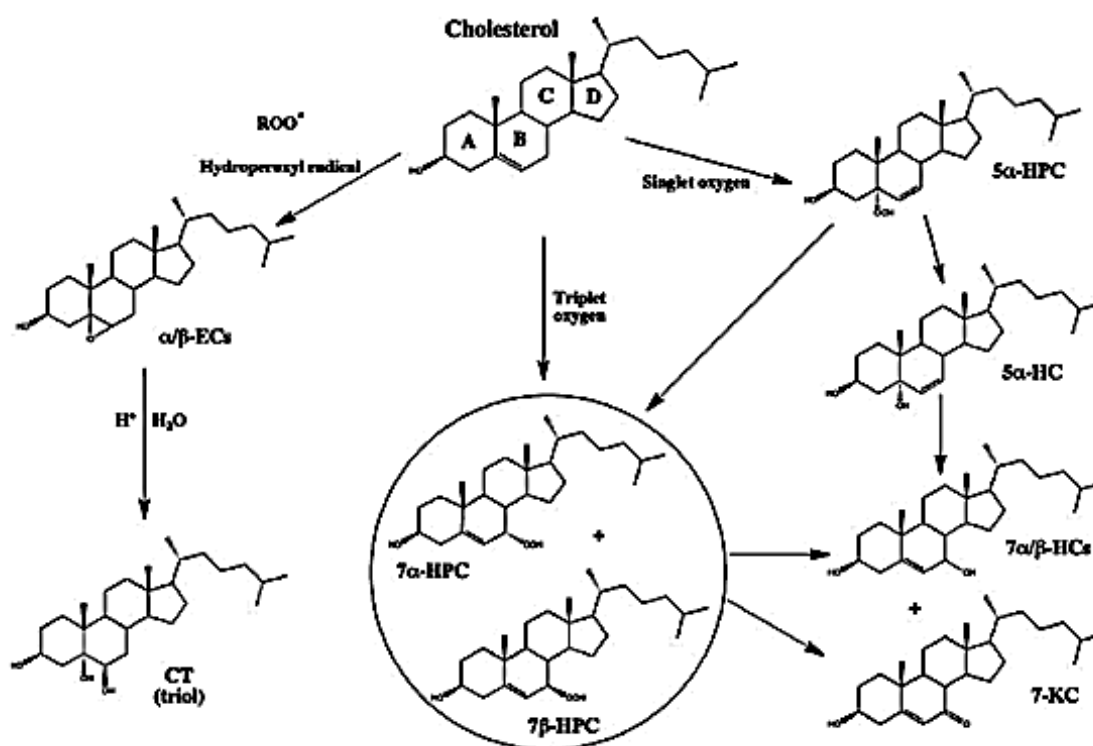


Figura 10. Rutas de oxidación del colesterol (Cardenia *et al.*, 2013).

La PGHS 1 y 2 son expresadas por una activación celular, frecuentemente en respuesta de mediadores inflamatorios, estas formas pueden ser totalmente inhibidas con indometacina, y la aspirina inhibe completamente a la PGHS 1 (Wohlfeil y Campbell, 1997). Varias investigaciones soportan la conclusión de que los oxisteroles, principalmente aquellos se encuentran oxidados en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), tienen efectos patológicos como la inducción de las células (sanas) a la muerte celular apoptótica. La apoptosis inducida por los oxisteroles está fuertemente implicada en la patogénesis de arterosclerosis y otras enfermedades (Lordan *et al.*, 2009).

2.7. Inhibidores de COX en invertebrados marinos

La síntesis de PG puede ser inhibida usando anti-inflamatorios no esteroideos (AINES). En crustáceos se ha reportado disminución en la concentración de PG usando indometacina en larvas de cípridos (*B. amphitrite*) mientras que esculetina y nordihidrometacina (inhibidor de LOX) inhibieron la generación de ácido hidroieicosapentaenoico (HEPE) (Knight *et al.*, 2000). Freas y Grollman (1980) encontraron que las branquias de bivalvos *Modiolus demissus* incrementan la producción de PG con estrés hipoosmótico, pero este incremento fue inhibido con AINES. Alfaro-Montoya (2015) encontró efectos positivos en el desarrollo ovárico de hembras de *L. vannamei* y *L. stylirostris* a las que se les inyectó ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico y concluyó que este efecto se debía a la inhibición de PG.

Se ha mostrado que la exposición a diclofenaco causa alteraciones estructurales y necrosis en células de las branquias de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Triebkorn *et al.*, 2004); en crustáceos las células pilares y ionocitos tienen la misma función y son importantes para el mantenimiento de la integridad estructural de las lamelas branquiales (Freire *et al.*, 2008), estas similitudes pueden suponer que los crustáceos pueden tener respuestas similares a la exposición de inhibidores de COX (Eades y Waring, 2010). Prameswari *et al.* (2017) encontraron que al suministrar indometacina y ácido acetilsalicílico (ASA) a hembras de cangrejo de agua dulce *Oziothelphusa senex* se reducen significativamente la talla de los ovarios y se retarda el desarrollo ovárico. Lo anterior indica que los inhibidores de COX son activos en invertebrados marinos y, por lo tanto, pueden verse modificadas sus concentraciones de PG al suministrar un inhibidor. En la Tabla VI se enlistan diversos trabajos donde se han suministrado inhibidores de COX en organismos marinos.

Tabla VI. Estudios en invertebrados marinos donde se han usado inhibidores de COX

| Referencia | Organismo | Inhibidor de COX usado | Tipo de suministro | Duración | Efecto |
|---------------------------------|---|---------------------------------------|---|--------------------------------|--|
| Freas y Grollman, 1980 | Bivalvo <i>Modiolus demissus</i> | Ácido acetilsalicílico e indometacina | Solución 5 milimolar de aspirina y 1 milimolar otra de indometacina | N/D | Inhibición de PGE ₂ en branquias con aspirina |
| Knigh <i>et al.</i> , 2000 | Balano <i>Balanus amphitrite</i> | Indometacina | 1-100 mM. En solución salina | 24 horas | Inhibición de PG |
| Heckmann <i>et al.</i> , 2007 | <i>Daphnia magna</i> | Ibuprofeno | 10–100 mg IB | 14 días | No hay efecto en supervivencia, si en la reproducción |
| Alfaro-Montoya, 2015 | Camarón <i>L. vannamei</i> , <i>L. stylirostris</i> | Ibuprofeno | 0.01 y 0.1 mg/kg | Semana 0, 4, 5 y 6, 8, 9 y 10. | Ibuprofeno a 0.1 µg indujo mayor tasa de desarrollo de ovarios |
| Prameswari <i>et al.</i> , 2017 | Cangrejo <i>Oziothelphusa senex senex</i> | Indometacina y ácido acetilsalicílico | 1 µg en 10 ml de etanol | 1, 7, 14 y 21 días | Reducción de la talla de ovarios |

3. JUSTIFICACIÓN

El camarón blanco del Pacífico es una de las especies más importantes cultivadas en todo el mundo; sin embargo, para el cultivo de este organismo se necesitan grandes cantidades de alimento. El alimento de camarón es muy costoso, principalmente porque para su fabricación se utilizan harina y aceite pescado; la disponibilidad de estos ingredientes cada vez es más escasa, por tal motivo se han buscado nuevas alternativas al uso de estos ingredientes.

Previamente, observamos que algunos subproductos de pesquerías no solo fueron un adecuado sustituto de la harina de pescado a nivel de crecimiento, sino que, además, incrementaron la supervivencia de los camarones sometidos a estrés por manejo. Entre los objetivos de la presente tesis, está establecer la razón por la cual aumenta la supervivencia al estrés de los camarones alimentados con subproductos; una alternativa podría ser el contenido de micronutrientes, tales como pigmentos, vitaminas, etc. presentes en grandes cantidades en subproductos, a diferencia de la harina de pescado. Algunos pigmentos pueden inhibir la peroxidación de lípidos y con ello, la producción de compuestos lipídicos bioactivos, como son los COP y los isoprostanoïdes, incrementando así la supervivencia durante el cultivo y particularmente en condiciones de estrés.

Por otro lado, se pretende evaluar en un bioensayo el efecto de un inhibidor de COX sobre la supervivencia después de someter a los camarones a estrés, condiciones similares a las que ocurren en la producción comercial al trasladar a los organismos entre estanques para corregir densidad o cuando se hacen biometrías rutinarias. Se pretende evaluar si el inhibidor de COX administrado en el alimento disminuye la producción de PG y con ello, aumenta la tolerancia al estrés.

Al utilizar subproductos de otras pesquerías que sustituyan la harina y aceite de pescado, se pretende proponer nuevos alimentos para camarón de menor precio, que además incrementen la tolerancia al estrés por manejo de los camarones, convirtiéndose así en un potencial alimento funcional.

4. HIPÓTESIS

Si en los sistemas de cultivo de camarón existen diversas fuentes de estrés que aumentan el metabolismo y el uso de reservas energéticas, incrementando la producción de ROS, PG y diversos biolípidos derivados de la oxidación, que comprometen el desempeño fisiológico de los organismos, entonces el uso de subproductos marinos en los alimentos para camarón puede mejorar el crecimiento, contrarrestando los efectos pro-oxidantes y mejorar su respuesta ante un efecto de estrés.

1. Si se alimenta a los camarones con alimentos ricos en pigmentos, fitoesteroles y HUFA n-3 (como los que contienen subproductos marinos), entonces se incrementará la producción de PGE₃, contrarrestando los efectos negativos de los biolípidos derivados de la oxidación e incrementando el rendimiento del cultivo (objetivo 1).

2. Los inhibidores de COX reducirán la producción de PG₂ e incrementarán la producción de PGE₃, reduciendo la inflamación e incrementando la supervivencia del camarón (objetivos 2 y 3).

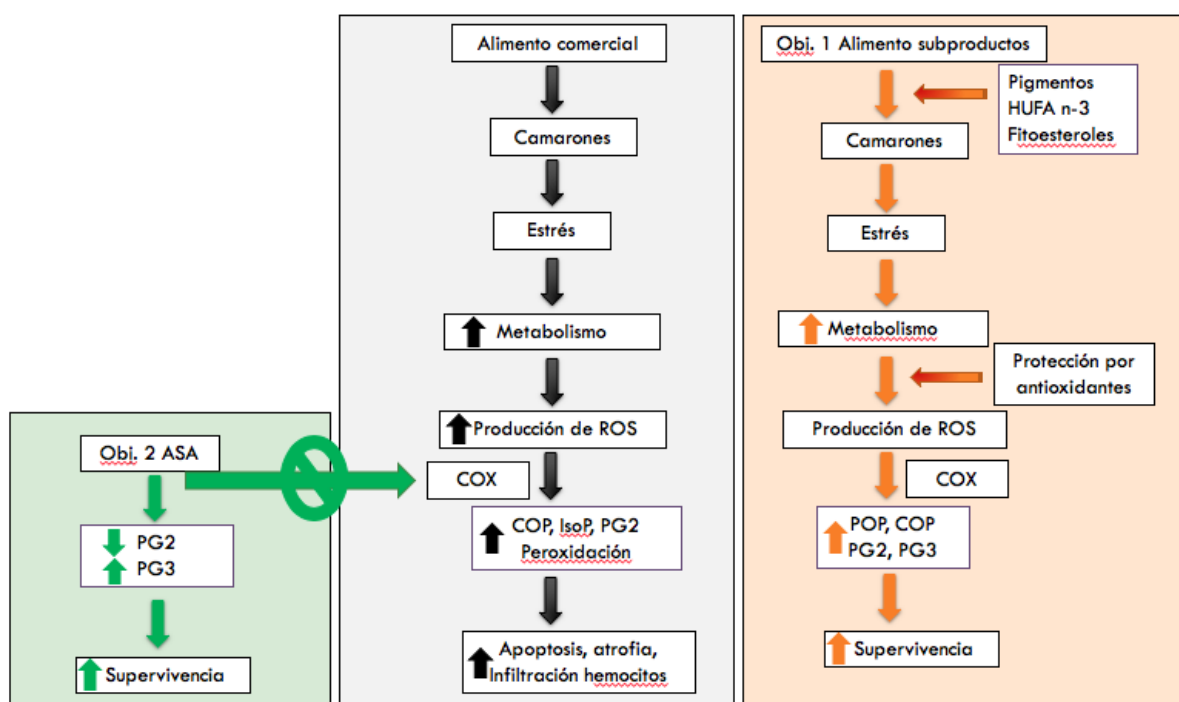


Figura 11. Diagrama de las hipótesis planteadas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la producción de lípidos bioactivos mediada por ciclooxigenasas en camarones juveniles alimentados con alimentos que contienen subproductos marinos, y sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de alimentos que contienen subproductos marinos sobre la producción de lípidos bioactivos en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.
2. Determinar la dosis, el tiempo y la administración más adecuada de un inhibidor de ciclooxigenasas suministrado en el alimento y evaluar su efecto sobre la producción de prostaglandinas en camarones.
3. Evaluar el efecto de un inhibidor de ciclooxigenasas sobre la producción de prostaglandinas y la supervivencia en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Evaluación del efecto de alimentos que contienen subproductos marinos sobre la producción de lípidos bioactivos en camarones sometidos a estrés.

6.1.1 Obtención de los ingredientes y elaboración de harinas experimentales

Se recolectaron vísceras de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) de Puerto San Carlos, B.C.S., México y se transportaron en hielo al laboratorio de Nutrición Acuícola. El calamar congelado entero (*Dosidiscus gigas*) se obtuvo de un distribuidor local de mariscos (Comercializadora de Mariscos de BCS); los calamares fueron eviscerados y solo se usó la parte no consumible. Los alimentos experimentales fueron preparados en el Laboratorio de Nutrición Acuícola en del CIBNOR, como se describe en Toyas-Vargas *et al.* (2017). La materia prima se sumergió dentro de una olla de acero inoxidable (80 L) con agua hirviendo durante 10 minutos, luego se escurrió y secó por 24 horas a 60 °C en un horno con flujo de aire horizontal (VWR International, Modelo 1680, Cornelius, OR, EUA). Las materias primas ya secas se pulverizaron en un pulverizador (PULVEX®, modelo 200) y se almacenaron en bolsas de plástico bajo refrigeración (4 °C) hasta su uso. Se tomaron muestras de las harinas experimentales para realizar análisis proximales y de energía como se muestra en el inciso 6.1.1.1 a continuación.

6.1.1.1 Análisis químico proximal de las harinas

De las harinas experimentales se destinó una muestra de cada lote para hacer análisis químico proximal, por triplicado, siguiendo los métodos oficiales de la AOAC (2005). La humedad se determinó en estufa (Terlab®) a 105 °C durante 4 horas. La cuantificación de cenizas, por incineración de las muestras en una mufla (Thermolyne 6000®) a 550 °C durante 6 horas. El análisis de proteína cruda, se realizó por el método de DUMAS, con un equipo analizador de Nitrógeno/Proteína (Leco FP-528). La cuantificación de extracto etéreo se hizo usando un sistema de auto extracción (Soxtec AVANTI 2050®), usando éter de petróleo como solvente extractor. Para determinar la fibra cruda, se hizo una hidrólisis ácido-básica con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en un

digestor (Fiber Tec M6 Tecator®) equipado con una unidad de extracción caliente y una unidad de extracción fría. Se calculó el extracto libre de nitrógeno (ELN) a partir de la diferencia entre 100% y la suma de los valores de las determinaciones de cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda. Para la determinación de energía bruta se usó un calorímetro adiabático (PARR1261®).

Tabla VII. Composición proximal (g/100 g de materia seca, excepto humedad) y de energía de las harinas usadas en la fabricación de los alimentos experimentales

| | Harina de pescado | Harina de vísceras de almeja Catarina | Harina de vísceras de calamar |
|-----------------|--------------------------|--|--------------------------------------|
| Humedad | 6.12 ± 0.10 | 5.28 ± 0.00 | 9.72 ± 0.20 |
| Proteína | 69.68 ± 0.13 | 61.00 ± 0.20 | 63.40 ± 0.04 |
| Extracto Etéreo | 10.75 ± 0.15 | 15.26 ± 0.20 | 10.43 ± 0.03 |
| Fibra Cruda | 0.33 ± 0.06 | 0.23 ± 0.10 | 0.77 ± 0.12 |
| Cenizas | 15.79 ± 0.10 | 9.09 ± 0.00 | 7.13 ± 0.05 |
| ELN | 3.45 | 14.41 | 18.27 |
| Energía (cal/g) | 4,915.68 ± 4.89 | 5,435.54 ± 4.00 | 5,262.02 ± 1.74 |

Medias ± desviación estándar.

6.1.2 Fabricación de los alimentos experimentales

Se diseñaron tres alimentos experimentales: un alimento Control, que contenía harina de pescado, y dos alimentos que contenían 10% de harina de vísceras de calamar o harina de vísceras de almeja Catarina, reemplazando parcialmente la harina de pescado. En la Tabla VIII se muestra la composición en ingredientes de los alimentos.

Para fabricar los alimentos, todos los macroingredientes se pulverizaron en pulverizador y se pasaron a través de un tamiz con luz de malla de 0.25 mm. Los microingredientes [ácido algínico, premezclas de vitaminas y minerales, fosfato de sodio dibásico, cloruro de colina, vitamina C y butilhidroxitouelo (BHT)] se mezclaron primero manualmente en un recipiente de plástico y luego se agregaron a los macroingredientes. Los ingredientes secos de cada alimento se mezclaron durante 5 minutos en una batidora vertical con capacidad de 1.5 L (Kitchen Aid^{MR}, profesional 600), y después se agregó una emulsión hecha con aceite de hígado de bacalao y lecitina de soya. Una vez que la mezcla

era homogénea, se agregó agua (aproximadamente al 40% del peso total de la masa) y finalmente se mezcló por otros 10 min. La masa resultante se extruyó en un molino de carne de ¾ HP (TOR-REY, Monterrey, NL, México) a través de una criba con orificios de 2 mm de diámetro, según lo descrito por Civera y Guillaume (1989). Los pellets se secaron en un horno de flujo horizontal a 45°C durante aproximadamente 12 h, hasta que alcanzaron una humedad de 10%, y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Tabla VIII. Composición en ingredientes (g/100 g, base húmeda) de los alimentos experimentales utilizados en el bioensayo de crecimiento.

| Ingrediente | Control | Catarina | Calamar |
|---|---------|----------|---------|
| Harina de pescado (sardina) ¹ | 29.50 | 19.50 | 19.50 |
| Harina de subproductos de calamar ² | ---- | ---- | 10.00 |
| Harina de subproductos de Catarina ² | ---- | 10.00 | ---- |
| Harina Integral Trigo ³ | 36.15 | 36.15 | 36.15 |
| Pasta de soya ⁴ | 23.0 | 23.0 | 23.0 |
| Aceite de hígado de bacalao ⁵ | 2.80 | 2.80 | 2.80 |
| Lecitina de soya ⁶ | 2.50 | 2.50 | 2.50 |
| Colesterol ⁷ | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Ácido algínico ⁸ | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Premezcla vitaminas crustáceos ⁹ | 1.80 | 1.80 | 1.80 |
| Fosfato dibásico de sodio ¹⁰ | 1.2 | 1.20 | 1.20 |
| Premezcla minerales crustáceos ¹¹ | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Cloruro de colina ¹² | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Vitamina C ¹³ | 0.08 | 0.08 | 0.08 |
| Antioxidante BHT ¹⁴ | 0.02 | 0.02 | 0.02 |

¹ Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V. Guadalajara, Jal., México.

² Harinas preparadas en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR, a partir de *Argopecten ventricosus* y de calamar gigante *Dosidiscus gigas*

³ Alimentos Balanceados de La Paz. La Paz, B.C.S.

⁴ ADM Bioproductos S.A. de C.V. Durango, México.

⁵ Drogería Cosmopolita. Distrito Federal, México

⁶ El Sol Naciente. La Paz, B.C.S., México.

⁷ Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

⁸ Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

⁹ Premezcla de vitaminas (UI o mg kg⁻¹ de premezcla): A acetato, 15,000 UI; D3, 7,500 UI; E, 400; K3, 20; tiamina HCl, 150; riboflavina, 10; piridoxina HCl, 50; ácido pantoténico, 100; niacina, 300; biotina, 1; inositol, 500; ácido fólico, 20; cianocobalamina, 0.1

¹⁰ Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

¹¹ Premezcla de minerales (mg 100 g⁻¹ de premezcla): MgSO₄·7H₂O, 500; ZnSO₄·7H₂O, 90; KCl, 500; MnCl₂·4H₂O, 23.4; CuCl₂·2H₂O, 5; KI, 5; CoCl₂·6H₂O, 2.5

¹² Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

¹³ ROCHE. Ciudad de México, México.

¹⁴ ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio, USA.

Se tomó muestra de cada alimento para hacer análisis de composición química proximal y de energía en el laboratorio de Análisis Químicos Proximales del CIBNOR y se realizaron los análisis como se describe en el inciso 6.1.1.1.

6.1.3 Hidroestabilidad de los alimentos experimentales

La estabilidad de los alimentos se determinó mediante la pérdida de peso de materia seca de los pellets en agua de mar (37 UPS) a 27°C de acuerdo con el método de Obaldo *et al.* (2002). Se utilizaron tres réplicas por muestra de 2 g cada una, de los alimentos se agitaron en agua de mar durante 1 hora a 100 rpm en un agitador orbital (Modelo OR200, Daigger & Co., Vernon Hills, IL, EUA).

6.1.4 Análisis de lípidos en los alimentos experimentales

Para la extracción de los lípidos en los alimentos se pesó 100 mg por triplicado de los alimentos (Control, Catarina y calamar) y molieron con una varilla de vidrio, luego se humedecieron con agua destilada, también se les añadió cloroformo / metanol (2:1, v/v) para extraer los lípidos durante 24 horas, después de que las muestras fueron sonicadas 15 minutos en agua helada (4°C). A todas las muestras se añadieron 10 µL de BHT (butilhidroxitolueno) como antioxidante, 10 µL de 23:0 (ácido tricosanoico) como patrón interno y 10 µL de 5- α -coléstano y se almacenaron a -20 °C.

6.1.4.1 Análisis de clases de lípidos

Para la evaluación de las clases de lípidos en los alimentos, los lípidos se extrajeron como se describe en Palacios *et al.* (2005), se tomó una alícuota del extracto lipídico y se filtró en una microcolumna de sílice y se evaporó a 0.25 mL, luego se separó usando chromarods S5, que previamente se llevaron a una humedad constante en una cámara de hidratación al 6% como lo describen Palacios *et al.* (2007), y analizado con un Iatroscan TLC / FID MK-5. Las barras se escanearon a una velocidad de flujo de hidrógeno de 160

ml/min, flujo de aire de 2000 ml/min y una velocidad de escaneo de 30 mm/min. Las clases de lípidos se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención con los estándares apropiados (Sigma, St. Louis, EUA), y su concentración se calculó a partir del área de pico de cada estándar.

6.1.4.2 Análisis de ácidos grasos totales

Se usó otra alícuota del extracto de lípidos para separar los metil-esteres de ácidos grasos (FAME). Los FAME se analizaron por cromatografía de gases (GC-6890N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) con una columna capilar DB-23 (50% de cianopropil-metilpolisiloxano) usando helio como gas acarreador, una rampa de temperatura de 110 a 220 °C a una velocidad de 3.5 °C/min, un inyector a 260 °C y un detector de ionización de llama (FID) establecido a 280 °C, e identificado comparando sus tiempos de retención con los de los estándares cromatográficos (componente Supelco 37 FAME Mix), como se describe en Palacios *et al.* (2005).

6.1.4.3 Análisis de esteroides totales

Para la determinación de esteroides, se tomó una alícuota del extracto lipídico, se evaporó a sequedad en un evaporador centrífugo al vacío (JOUAN RCT90, Saint-Herblain, Francia), a una temperatura no mayor a 30 °C. Se esterificaron las muestras agregando a cada muestra 2 mL de metóxido de Sodio 0.5 M en metanol, con agitación constante por 90 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 1.2 mL de hexano más 2 mL de agua previamente extraída con hexano y se agitó por 10 minutos. Se centrifugó a 2000 rpm (rotor JA-14, Beckman Coulter) por 5 minutos a 5 °C. La muestra se separó en dos fases y se desechó la parte inferior (metanol + sodio + impurezas); dejando únicamente el hexano que contiene los esteroides. Después se procedió a realizar lavados agregando 2 mL de agua previamente extraída con hexano, se agitó en vortex y se centrifugó a 2000 rpm (rotor JA-14, Beckman Coulter) por 5 minutos a 5 °C; siempre descartando la fase inferior (agua + residuos). La muestra se almacenó a -20 °C hasta que se congeló el agua. Se recuperó los

esteroles más hexano y se transfirió a un vial ámbar de 2 mL y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta proceder inyectarlos al CG-FID.

Los esteroles se analizaron en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 6890N con detector de ionización de flama (FID), utilizando una columna capilar Rtx®-65 de Silica fundida (Crossbond 65%-difeníl-35% dimetil polisiloxano) de 15 m de longitud \times 0.25 μm de espesor de película \times 0.25 mm de diámetro interno, marca Restek; utilizando hidrógeno como gas acarreador a presión constante de 50 psi y una rampa de temperatura de 50–260 $^{\circ}\text{C}$. La identificación de los esteroles se realizó comparando el tiempo de retención del cromatograma de la muestra con los estándares y la cuantificación en base al estándar interno de la muestra.

6.1.5 Bioensayo de crecimiento

Se realizó un bioensayo de crecimiento, con una duración de 60 días, en el Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola del CIBNOR. Para ello, se obtuvieron juveniles de la especie *Litopenaeus vannamei* provenientes de una granja comercial (Acuicultura MAHR, S.A de C.V, La Paz, B.C.S.) y tras haber sido aclimatados a las condiciones de cultivo en el laboratorio, fueron seleccionados 180 organismos con un peso de $1.5 \pm 0.02\text{ g}$, mismos que se distribuyeron de forma aleatoria en 9 tanques circulares de fibra de vidrio con capacidad de 600 L a una densidad de 15 camarones por tanque. Los alimentos fueron asignados de forma aleatoria en los tanques a manera de contar con 3 réplicas por tratamiento.

Cada tanque fue equipado con dos calentadores sumergibles de 250 W, dos piedras de aireación y suministro de agua de mar filtrada a través de un filtro de arena, filtros de cartucho (10 y 5 μm) y luz ultravioleta. La temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto se registraron una vez al día ($27.0 \pm 0.7\text{ }^{\circ}\text{C}$, $36.0 \pm 0.6\text{ UPS}$ y $5.0 \pm 0.3\text{ mg/L}$, respectivamente). Se realizó una vez al día el intercambio de agua de $\sim 50\%$ durante la mañana. Al inicio del bioensayo, la alimentación fue del 10% de la biomasa en cada tanque, distribuidas en dos raciones. Las raciones se ajustaron diariamente según el consumo aparente. El alimento no consumido, estimado visualmente, las mudas y los muertos fueron

retirados de los tanques diariamente, así como. Al final del bioensayo, se calculó la supervivencia, tasa de crecimiento, el consumo aparente de alimento incremento de peso corregido, (Kitabayashi *et al.*, 1971) y el factor de conversión alimenticia (FCA) para cada tratamiento por medio de las siguientes fórmulas:

$$\text{Supervivencia} = \left(\frac{\text{Número final de organismos}}{\text{Número inicial de organismos}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Tasa de crecimiento (\%)} = \left[\frac{\text{Peso promedio final} - \text{peso promedio inicial}}{\text{peso promedio inicial}} \right] \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Consumo de alimento} = \frac{\text{alimento consumido,g}}{\text{No.camarones/día}} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{Incremento en biomasa corregida} = \\ [\text{biomasa final} + (((\text{Peso final} + \text{Peso inicial})/2) \times \text{Número de muertos})] \\ - \text{Biomasa inicial} \quad (4) \end{aligned}$$

$$\text{FCA} = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Incremento en biomasa corregida}} \quad (5)$$

6.1.6 Reto de estrés

Al final del bioensayo de crecimiento, se realizó un reto de estrés por exposición aérea. Para ello, se capturaron organismos con una red, y se seleccionaron cuatro camarones, en estadio de intermuda C, de cada tanque, se eutanasiaron en nitrógeno líquido y posteriormente, se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bolsas etiquetadas; estos camarones

correspondieron al grupo Sin Estrés (SE). El resto de los camarones (diez camarones en estadio de intermuda C por tanque, 3 tanques por tratamiento) correspondieron al grupo con Estrés (E). Estos camarones se colocaron individualmente en cubetas de 20 L sin agua, se dejaron expuestos al aire por 15 minutos, y después se regresaron a los tanques con agua de mar y aireación durante 30 minutos (tiempo de recuperación). Al cabo de este tiempo, se registró la presencia de coloración blanca en el músculo de los camarones, así como los camarones muertos. Posteriormente, se eutanasiaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta sus análisis.

6.1.7 Preparación de muestras para análisis de lípidos en camarón.

Se disectaron tres camarones de cada tratamiento con bisturí sobre una placa de hielo, se pesaron muestras de 100 mg de músculo, se añadió una mezcla solvente de cloroformo / metanol (2:1, v/v) para extraer los lípidos por 24 horas; después de que las muestras se molieron con un Potter y se sonicaron (Modelo 2510: Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EUA) durante 15 minutos. A todas las muestras se añadieron 10 μL de BHT como antioxidante, 10 μL de 23:0 como patrón interno y 10 μL de 5- α -colestano y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.7.1 Determinación de ácidos grasos en acilglicéridos y en fosfolípidos del músculo de camarón.

Del extracto lipídico, se tomaron dos alícuotas para realizar la separación de acilglicéridos y fosfolípidos por elución diferencial en micro columnas empaquetadas con sílice hidratado al 6%, utilizando 10 ml de cloroformo: metanol (98:2 v/v) para acilglicéridos y 15 ml de metanol para la fracción polar de cada muestra (Palacios *et al.*, 2001). Todas las muestras se evaporaron a sequedad por medio de centrifugación al vacío y burbujeo de nitrógeno para ser *trans*-esterificadas con trifluoruro de boro al 14% en metanol (BF_3 , Supelco®) a una temperatura de $85\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Posteriormente, todas las muestras se llevaron a temperatura ambiente para la eliminación de impurezas utilizando hexano (J.T. Baker®) y agua destilada. Las muestras se centrifugaron a $720 \times g$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, Fullerton,

CA, EUA) en cada lavado. Posteriormente, se esperó a que se congelara el agua a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hora y se recuperó la fase de hexano que contiene los FAME y se transfirieron a un vial ámbar de 2 mL y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su inyección en el cromatógrafo de gases con detección por ionización de flama (CG-FID) según lo descrito por Palacios *et al.* (2001).

Los FAME de lípidos acilclicéridos y fosfolípidos se analizaron en un CG (Agilent Technologies 6890N) con detector FID; utilizando condiciones cromatográficas como se describe en el inciso 6.1.4.2.

6.1.7.2 Análisis de lípidos totales

Del extracto lipídico se tomó una alícuota para la determinación de lípidos totales. Primero se evaporaron a 0.25 mL con nitrógeno gaseoso y se pasaron a una microcolumna de sílice y tubo de 15 mL, se hizo eluir 10 mL de solución Folch y se llevaron a evaporar hasta su volumen inicial. Se colocaron tubos de borosilicato de 10 mL en un horno de temperatura controlada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (como mínimo), hasta peso constante. Se colocaron los tubos en un desecador y se dejaron enfriar mínimo 1 hora y se registró el peso de cada uno de los tubos. Se agregó 1 mL del extracto lipídico (obtenido por el método de Folch) y se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso. Se colocaron los tubos nuevamente en el horno de temperatura controlada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas y se pesaron los tubos con el extracto lipídico, y se hicieron los cálculos correspondientes para sacar el porcentaje de lípidos totales.

6.1.7.3 Análisis de pigmentos por HPLC

El análisis de pigmentos se llevó a cabo según lo descrito por Zapata *et al.* (2000) con unas modificaciones descritas en Quintana-López *et al.* (2019). Una alícuota de extracto lipídico del músculo y hepatopáncreas fueron evaporadas a sequedad con nitrógeno gaseoso y se resuspendieron en acetona grado HPLC. Los pigmentos fueron analizados por HPLC (Agilent technologies 1200, serie Infinity) equipado con una columna

ZORBAX C8 (4.6 × 100 mm, tamaño de partícula 3.5 µm) y un detector de arreglo de diodos (DAD) con una luz de onda de 440 nm, con una temperatura de 25 °C. La fase móvil consistió en un eluyente A (mezcla de metanol/acetonitrilo/solución acuosa de piridina 0.25 M (50:25:25, v/v/v), y un eluyente B (acetonitrilo/acetona, 80:20, v/v), el flujo fue de 1 mL/min. Los pigmentos se expresaron como proporción relativa y se identificaron comparando el tiempo de retención con sus estándares (DHI, Hoersholm, Denmark).

6.1.7.4 Análisis de esteroides

Los esteroides se analizaron como se describe en la sección 6.1.6

6.1.7.5 Determinación de PGEM

Se determinó la cantidad de PGEM en branquias de camarón mediante el kit ELISA (Cayman chemical Company, ítem N° 514531). Para la purificación de la muestra, se tomó cada camarón entero y se cortó el cefalotórax junto con el primer segmento del músculo abdominal sobre una lamina previamente congelada a -80 °C; se quitó el exoesqueleto sobre una placa de hielo, se cortó un trozo de 0.1g de branquias y se puso un tubo Eppendorf con 4x (4 veces su peso) de solución Hank. Cada muestra se homogenizó en un politrón por 60 segundos, después se agregó 4x (4 veces peso inicial de la muestra) de acetona helada y se incubaron a -20 °C por 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron a 400 g por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf limpios de 1 mL y secaron bajo una corriente de nitrógeno gaseoso. Las muestras fueron resuspendidas con 500 µL de buffer ELISA, y se procedió a realizar la derivatización de la muestra.

Para la derivatización se tomó una alícuota de 500 µL de cada muestra en tubos de ensayo de 5 mL, se agregaron 10 µL de buffer de carbonato y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se agregaron 200 µL de buffer de fosfato y 150 µL de buffer ELISA. Para acidificar las muestras, los extractos se pasaron a tubos de 10 mL y se acidificaron a

pH 4, adicionando buffer de acetato 1M. (1.23 g de acetato de sodio tri-hidratado, 2.35 mL de ácido acético, aforado a 1 L con agua ultrapura) adicionando el buffer hasta tener pH 4 en cada una de las muestras. Se agregaron dos volúmenes de etil acetato a cada muestra, se agitaron en un Vortex (VWR™), y después se centrifugaron a 200 g por 5 minutos en una centrifuga refrigerada Beckman (Allegra™ 21R, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). Se transfirió, con una pipeta de succión, el etil acetato (fase superior) a un vaso de vidrio limpio y se repitió esta extracción tres veces más, combinando toda la fase de etil acetato de cada muestra en el vaso de vidrio. Una vez limpias las muestras, se secaron con nitrógeno gaseoso y se resuspendieron en buffer de ensayo PGEM.

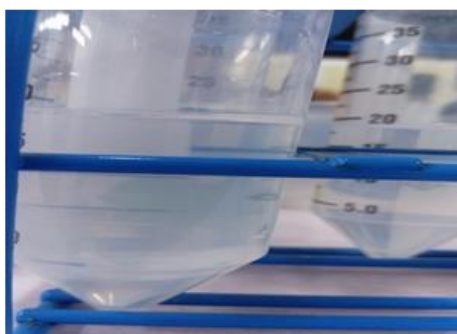
Para derivatizar el estándar, se transfirieron 100 µL de estándar PGEM ELISA en un tubo de ensaye limpio, y después diluyó con 900 µL de agua ultrapura. La concentración en esta solución (solución madre) fue de 40 ng/mL. Se tomó una alícuota de 50 µL en un tubo Eppendorf y se diluyó a 1 mL con buffer de ELISA (950 µL). Se agregaron 300 µL de buffer de carbonato y se incubó a 37 °C. Después se agregaron 400 µL de buffer de fosfato y 300 µL de buffer ELISA (esta solución es 1,000 pg/mL). Una vez derivatizadas las muestras y el estándar, se preparó la curva estándar, los reactivos, marcadores y se desarrolló la placa según lo descrito en el protocolo de ensayo de PGEM ELISA (Figura 12) y se leyó en un lector de microplacas (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 415 nm. Cada muestra se analizó por duplicado.



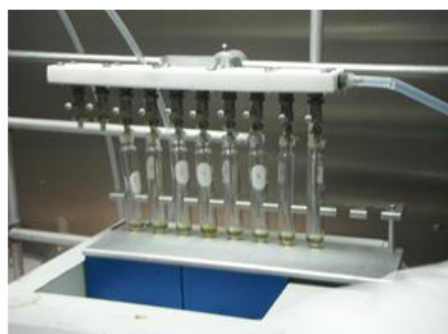
Diseción



Homogenización



Muestra en etanol



Evaporación de etil-acetato



Muestras purificadas



Lectura en microplaca a 415 nm

Figura 12. Técnica de determinación de PGEM por medio del kit ELISA (Cayman).

6.1.7.6 Análisis de hidroperóxidos (LOOH)

El contenido de LOOH en músculo se estimó a partir del extracto de cloroformo-metanol (2:1 v/v) por el método de tiocianato férrico como se describe en Zamora *et al.*

(2017), se leyó a una absorbancia de 505 nm en un lector de microplacas (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), utilizando hidróperóxido de cúmeno para la construcción de la curva estándar (Sigma-Aldrich).

6.1.7.7 Determinación de óxidos de colesterol (COP)

La determinación de óxidos de colesterol en el músculo de camarón se realizó según lo descrito por Soto-Rodríguez *et al.* (2008). Para la extracción de los lípidos de las muestras se tomó un pool de camarón entero liofilizado, se homogenizó en un mortero de porcelana y se volvió a pesar en una balanza, se tomó 30 g de este y se colocó dentro en un frasco de vidrio de 500 mL de capacidad y se agregó 100 mL de cloroformo y 100 mL de metanol (1:1, v/v), se llevó a un sonicar a 60 °C por 20 min para homogenizar un poco más la muestra, pasado este tiempo se agregó 100 mL más de cloroformo para cumplir con la metodología de Folch *et al.* (1956). Se llevó a una campana de extracción y todo el contenido se filtró con un papel filtro whatman n°1 para eluir la muestra y quitar las impurezas y restos de tejido. El extracto se transfirió a un embudo de separación de 500 mL y se agregó 100 mL de una solución de cloruro de potasio (KCL, 1M) agitando vigorosamente y se dejó reposar por 12 h a 4 °C para generar una separación. La fase inferior se colectó en un matraz bola de 250 mL previamente pesado y se secó en un rotaevaporador. El contenido de lípidos totales se determinó por gravimetría, después se resuspendió en 10 ml de hexano:isopropanol (3:2,v/v) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Una parte de la fracción lipídica extraída previamente se sometió a saponificación en frío. Se tomó una alícuota correspondiente a 100 mg de muestra y se puso en tubos de 10 ml (previamente pesados) y se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso, una vez seca, se llevó a determinar el peso por gravimetría, y se adicionaron los estándares internos; 25 µL de 19-hidroxicolesterol como estándar interno para la cuantificación de los COP (12 µg en hexano:isopropanol (4:1 v/v) y 70 µL de dihidroxicolesterol (140 µg en hexano:isopropanol (4:1 v/v)) como estándar interno de colesterol. La mezcla se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se adicionaron 3 mL de una solución metanólica de KOH 4N con BHT (5 mg/mL), se llevó a vortex por 30 segundos y se envolvió en papel aluminio y para sellar

herméticamente se colocó teflón en la parte superior del tubo y se tapó con taparroasca y se sometió a agitación orbital (120 rpm) por 18 h a temperatura ambiente. La muestra se sacó del agitador y se agregó 10 mL de diclorometano y 5 mL de ácido cítrico al 0.1%, se agitaron con vortex y se llevaron a centrifugar a 2000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, con una pipeta pasteur se quitó la fase superior y se hicieron 2 lavados más con ácido cítrico, entre los lavados se agitó manualmente y se desechó la fase superior. La parte inferior se pasó a matraz bola de 50 mL y se secó en rotaevaporador a 50 °C para eliminar el diclorometano, una vez seca la muestra, se resuspendió en 3 mL de diclorometano y se transfirió 0.3 mL y 2.7 mL a dos tubos cónicos para la cuantificación del colesterol y COP respectivamente (Figura 13).

El tubo con el extracto para colesterol se guardó a -20°C y se esperó hasta su silanización. La muestra destinada para COP se llevó a secar con nitrógeno gaseoso y se resuspendió en 300 µL de hexano:etilacetato (95:5, v/v) y se agitó en vortex por 10 segundos. Se procedió a hacer la purificación de COP por SPE-NH₂ (Rose-Sallin *et al.*, 1995).

Para la purificación de COP se montó una cámara de vacío con columnas empacadas de SPE-NH₂, se les puso sulfato de sodio anhidro y se activaron con 3 mL de n-hexano grado reactivo, se eluyó el solvente y se puso la muestra, el tubo donde estaba se lavó con 300 µL más de n-hexano:etilacetato (95:5, v/v) y se agregó a la columna. Se dejó eluir la muestra y posteriormente se agregó 6 mL de hexano: etilacetato (95:5, v/v); se desechó el eluato, y se hizo eluir 10 mL de hexano:etilacetato (90:10, v/v); se volvió a desechar el eluato y se cambió de tubo para eluir con 10 mL de acetona. Los COP eluidos con la fracción de acetona se pasaron a un tubo cónico y llevaron a sequedad con nitrógeno gaseoso, se resuspendió en 1 mL de n-hexano y se vuelve a secar con nitrógeno gaseoso. La silanización se llevó a cabo por adición de 0.5 mL de una mezcla de piridina: hexametildisilazano: trimetilclorosilano (5:2:1, v/v). Posteriormente, la mezcla es secada bajo corriente de nitrógeno a 40 °C y disuelta en 0.5 mL de n-hexano, 1 µL de la solución es inyectada en un cromatógrafo de gases. Los COP cuantificados por el método del estándar interno usando 19-HC. La identificación de cada uno de los picos en las muestras se realizó por comparación del tiempo de retención de cada COP.



1. Camarón liofilizado



2. Camarón en extracción



3. Filtrado de muestra



4. Separación de extracto lipídico en embudo de separación



5. Evaporación de solvente de la muestra



6. Purificación de COP en cámara de vacío

Figura 13. Extracción de COP en laboratorio de postcosecha en Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

6.1.7.8 Determinación de 8-isoprostanos

Se determinó la cantidad de 8-isoprostanos en branquias de camarón mediante el kit ELISA (Cayman chemicals, No. 516351). A cada muestra se agregó un 1ml de buffer de homogenización (0.1 M buffer de fosfato, pH 7.4 conteniendo 1 mM de EDTA y 0.005% BHT) por cada 100 µg de tejido en tubos de ensaye y se homogenizaron en un politrón cuidando que la muestra esté fría; después se centrifugó a $4000 \times g$ por 20 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se procedió con la hidrólisis de las muestras para ello se agregó 1ml de KOH al 15% (W/V), se incubaron a 40 °C por 60 minutos. Se neutralizaron agregando 10 veces más del volumen de la muestra original de 1 M buffer de fosfato de potasio, pH 7.0-7.4, ajustar siempre el pH para la primera muestra y después las demás. Las muestras una vez hidrolizadas, se purificaron agregando 2-4 volúmenes de etanol a todos los tubos y se llevaron a vortex para mezclar bien las muestras; se dejaron reposar a 4 °C por 5 minutos, luego centrifugaron a $1500 \times g$ por 10 minutos para remover el precipitado de proteínas; el sobrenadante se decantó a tubos limpios y se llevaron a liofilizar y se resuspendieron en buffer de acetato 1 M, pH 4.0, se activaron los cartuchos SPE (C-18) lavando con 5 ml de metanol y 5 ml de agua ultrapura (sin dejar que el cartucho se seque), se pasó la muestra y se lavó el cartucho con 5 ml de agua ultrapura seguido de 5 ml de hexano grado HPLC; se dejó secar la columna, se puso un tubo limpio y se eluyó el 8-isoprostano con 5 ml de etil acetato conteniendo 1% de metanol y se guardó a -80 °C. Se evaporó el etil acetato con nitrógeno gaseoso a sequedad y se agregó 500 µl de buffer de ELISA y se llevó a vortex para mezclar. Se procedió a realizar el ensayo ELISA como indica el manual de 8-isoprostanos, después se leyó la placa en un espectrofotómetro a 415 nm.

6.1.8 Expresión relativa de genes de enzimas antioxidantes

6.1.8.1 Extracción de ARN y análisis de integridad del ácido ribonucleico (ARN)

EL ARN fue extraído con TRIzol® Reagent (15596-026, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para determinar la cantidad y calidad del ARN extraído, las muestras se midieron en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-2000®, Thermo Scientific) utilizando el coeficiente de la relación de las lecturas de la absorbancia de 260 y 280 nm. Se consideraron como ARN de buena calidad aquellas muestras con un coeficiente entre 1.8 a 2.1, lo que significa que el ARN no está contaminado; el factor de conversión utilizado fue de 40 µg/mL.

El análisis de integridad y pureza del ARN extraído se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE-DEPC (Tris, Ácido bórico, EDTA). Para corroborar la ausencia de ADN genómico se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando 1 µL de muestra (50 ng de ARN) como templado en una reacción con oligonucleótidos específicos del gen 16s. Como control positivo se utilizó ADN de *L. dalli* y agua como control negativo. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa/Synergel® al 1% en buffer TBE 1X. Cada electroforesis se desarrolló en cámaras horizontales (Biorad) a 80V por 40 min. Los geles se documentaron con un fotodocumentador (Chemidoc®, Biorad).

6.1.8.2 Síntesis de ADN de doble cadena complementaria (ADNc)

Se realizó una transcripción inversa a partir del ARN total para obtener el ADN de doble cadena complementario (ADNc). Para ello, en un tubo eppendorf de 0.5 mL, se colocaron 4 µL de Buffer Improm-II 5× (A3803, Promega), 5 µL de agua destilada esterilizada, 2.5 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de dNTPs (10mM), 0.5 µL de RNAsina, 1 µL de oligo-dT18 (10mM), 1 µL de Improm-II RT (Promega) y finalmente 1 µL de ARN (1 µg) en un volumen final de 5 µL. La reacción se colocó en el termociclador (Biorad T100®)

Thermal Cycler) 5 min a 25 °C, 60 min a 42 °C y 15 min a 72 °C. Posteriormente, la reacción se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis.

6.1.8.3 Análisis de la expresión cuantitativa de los genes de respuesta mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Los niveles de expresión de los genes de interés se llevó a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). La eficiencia de la reacción de qPCR es un parámetro crucial en la determinación de la expresión de genes. Para determinar la eficiencia de la qPCR, se construyeron curvas estándar para cada uno de los genes de interés y el de referencia, a partir de cinco diluciones seriadas. La amplificación de las curvas se realizó por triplicado para cada una de las diluciones utilizando ADNc como templado.

A partir de las curvas de disociación se determinó si la amplificación de los genes mostró un producto único y específico visualizado como un solo pico. Posteriormente, se obtuvo la eficiencia de reacción de amplificación (E) para cada gen, graficando el log₁₀ de la concentración de cada dilución vs. los valores de Ct (ciclo de la PCR a partir del cual se detecta la fluorescencia). La pendiente de la recta (m) obtenida se utilizó para calcular la eficiencia mediante la siguiente fórmula:

$$E = 10^{\frac{-1}{m}} \quad (6)$$

Para cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: 1.5 µL de Buffer 10×, 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.25 µL de dNTPS (10 mM), 0.7 µL de oligonucleótidos (sentido y antisentido), 0.07 µL de Taq polimerasa platinum, 0.75 µL de Eva Green (20×), 5 µL de ADNc y 5.8 µL de agua estéril miliQ en un volumen final de 15 µL. El control negativo se realizó por duplicado utilizando agua estéril miliQ. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 95 °C; seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s, de hibridación a 55 °C por 1 min y de extensión a 75 °C por 20 s. Por último, se realizó una curva de disociación de 65 °C a 95 °C con un incremento de temperatura de 0.5 °C cada 10s. El análisis de las muestras se realizó por

duplicado y en cada corrida de amplificación se incluyó un control negativo por duplicado (sin templado, NTC). Los datos obtenidos fueron analizados por el método de Livak *et al.* (2001).

Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de secuencias específicas de *L. vannamei* obtenidas de NCBI GenBank con el software Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) y se investigaron para predecir dímeros de cebadores y estructuras secundarias utilizando RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Secuencias, los números de acceso de GenBank son: ARNm L8 (DQ316258.1) como gen de referencia, CytMnSOD (DQ029053.1), Catalasa (AY518322.1), GPX (AY973252.2) y COX (NC_009626.1) (Tabla IX).

Tabla IX. qPCR oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica de hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| Gen | Forward (5'-3') | Reversa (5'-3') | Tamaño (bp) |
|----------|--------------------------|------------------------|-------------|
| CytMnSOD | CTGACGAGAGCTTTGGATCATTTC | TGATTTGCAAGGGATCCTGGTT | 155 |
| CATALASA | GTGAAGTTTTACACAGAAGAAGG | AGGGGTTTCCTCTGTCAGAG | 219 |
| GPx | GCACCAGGAGAACTACTAC | TTCCAGGCAATGTCAGAG | 243 |
| COX | AGGTATTGCCCACTGATTCC | CTGGTGGAAGGTTATGCTG | 292 |

CytMnSOD: Gen superóxido dismutasa de manganeso citosólico de *L. vannamei*, CATALASA: Gen de mRNA catalasa de *L. vannamei* catalase (Cat), GPX: *L. vannamei* gen de ARNm de glutatión peroxidasa, COX: Gen ciclooxigenasa de *L. vannamei*.

6.1.9 Análisis estadísticos

Se hizo un ANOVA unifactorial para determinar diferencias significativas entre los alimentos con un nivel de significancia con un valor $P < 0.05$. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey.

Se realizó ANOVA bifactorial entre tratamientos, considerando los alimentos y el estrés como variables independientes. Cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey.

Se realizó un análisis de correlación multivariante (PCA) entre las variables seleccionadas analizadas en los camarones., considerando factores significativos mayores a ≥ 0.7 y valores propios > 1.0 , como se describe en Vite-García *et al.* (2014). Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software STATISTICA™ 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

6.2 Determinación de la dosis, el tiempo y la administración más adecuada de un inhibidor de ciclooxigenasas suministrado en el alimento y evaluación de su efecto sobre la producción de prostaglandinas en camarones.

6.2.1 Origen de los organismos

Juveniles de camarón *L. vannamei* con un peso promedio de 2.3 ± 0.14 g, fueron colectados de un estanque rústico en las instalaciones de la Unidad Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Los camarones se capturaron con una red atarraya y se fueron colocando en taras para limpiarlos, contabilizarlos y transportarlos a un tanque Rotoplast^{MR} con capacidad de 700 L y con aireación. Una vez que se reunió la cantidad deseada de camarones, se llevaron al Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola del CIBNOR para su aclimatación y, se mantuvieron en tanques de fibra de vidrio con capacidad de 1,200 L, alimentándolos a razón de dos raciones diarias con alimento comercial (Camaronina con 35% de proteína). Se registraron los parámetros físicoquímicos, alimento consumido, mudas y muertos hasta alcanzar un peso promedio de 3.7 g para iniciar el bioensayo.

6.2.2 Fabricación de alimentos Control y con ASA

Se formularon alimentos con 35% de proteína y 8% de lípidos, para cubrir los requerimientos nutricionales de juveniles de la especie *L. vannamei*. Se elaboraron cinco

alimentos: un alimento Control y cuatro alimentos experimentales con dosis de 50, 100, 200 y 400 mg de ASA por kg de peso del camarón (alimentos ASA50, ASA100, ASA200 y ASA400), siguiendo el método descrito en la sección 6.1.2. El ASA se agregó a la mezcla de macro y microingredientes de cada alimento (excepto el Control) una vez que estuvieron listos para mezclarse en la batidora, y se continuó con el proceso de fabricación. La composición en ingredientes de los alimentos se muestra en la Tabla X.

Tabla X. Composición en ingredientes (g/100 g base húmeda) de los alimentos utilizados en el bioensayo dosis-ASA

| | Control | ASA50 | ASA100 | ASA200 | ASA400 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Ingredientes | | | | | |
| Harina de pescado (sardina) ¹ | 19.00 | 19.00 | 19.00 | 19.00 | 19.00 |
| Pasta de soya ² | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 | 30.00 |
| Harina Integral Trigo ³ | 25.95 | 25.95 | 25.95 | 25.95 | 25.95 |
| Harina de manto de calamar ⁴ | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 |
| Aceite de hígado de bacalao ⁵ | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 | 5.00 |
| Lecitina de soya líquida Industrial ⁶ | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Colesterol ⁷ | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Ácido algínico, sal de sodio ⁸ | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 | 2.00 |
| Premezcla vitaminas crustáceos ⁹ | 1.80 | 1.80 | 1.80 | 1.80 | 1.80 |
| Fosfato dibásico de sodio ¹⁰ | 1.20 | 1.20 | 1.20 | 1.20 | 1.20 |
| Premezcla minerales crustáceos ¹¹ | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Cloruro de colina ¹² | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 |
| Vitamina C Rovimix Stay-C35 ¹³ | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 |
| Antioxidante BHT ¹⁴ | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| Ácido acetilsalicílico ¹⁵ | 0.00 | 0.20 | 0.40 | 0.80 | 1.60 |
| Alfa-celulosa ¹⁶ | 5.00 | 4.80 | 4.60 | 4.20 | 3.40 |

¹ Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V. Guadalajara, Jal., México.

^{2,6} Promotora Industrial Acuasistemas, S.A. de C.V. La Paz, B.C.S., México

³ MUNSA Molinos S.A. de C.V.

⁴ Harina preparada en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR a partir de calamar gigante *Dosidiscus gigas*

⁵ Drogería Cosmopolita. Distrito Federal, México

⁷ MP Biomedicals

⁸ Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

⁹ Premezcla de vitaminas (UI o mg/kg): A acetato, 15,000 UI; D3, 7,500 UI; E, 400; K3, 20; tiamina HCl, 150; riboflavina, 10; piridoxina HCl, 50; ácido pantoténico, 100; niacina, 300; biotina, 1; inositol, 500; ácido fólico, 20; cianocobalamina, 0.1

¹⁰ Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

¹¹ Premezcla de minerales (mg/100): MgSO₄·7H₂O, 500; ZnSO₄·7H₂O, 90; KCl, 500; MnCl₂·4H₂O, 23.4; CuCl₂·2H₂O, 5; KI, 5; CoCl₂·6H₂O, 2.5

¹² MP Biomedicals

¹³ Promotora Industrial Acuasistemas, S.A. de C.V. La Paz, B.C.S., México

¹⁴ ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio, USA. ADM Bioproductos S.A. de C.V. Durango, México.

¹⁵ Farmacias Similares

¹⁶ Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

6.2.3 Bioensayo y muestreos

Se distribuyeron 300 organismos con peso promedio de 3.7 ± 0.08 g en 78 acuarios de 60 litros, se mantuvieron a una temperatura constante de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidad de 39 UPS y oxígeno disuelto mayor a 5mg/L. Se aclimataron durante 15 días y se alimentaron a razón de dos raciones diarias con el alimento Control (con harina y aceite de pescado). Pasado el tiempo de aclimatación, se inició el bioensayo distribuyendo los organismos aleatoriamente en seis tratamientos: Control, ASA50, ASA100, ASA200, ASA400 y ayuno (sin alimentación).

Cada tratamiento tuvo 5 tiempos de muestreo: a las 0, 3, 6 y 24 horas; para cada tiempo se tuvieron tres réplicas, con 4 organismos en cada réplica, para un total de 12 camarones por tratamiento en cada tiempo (Figura 14).

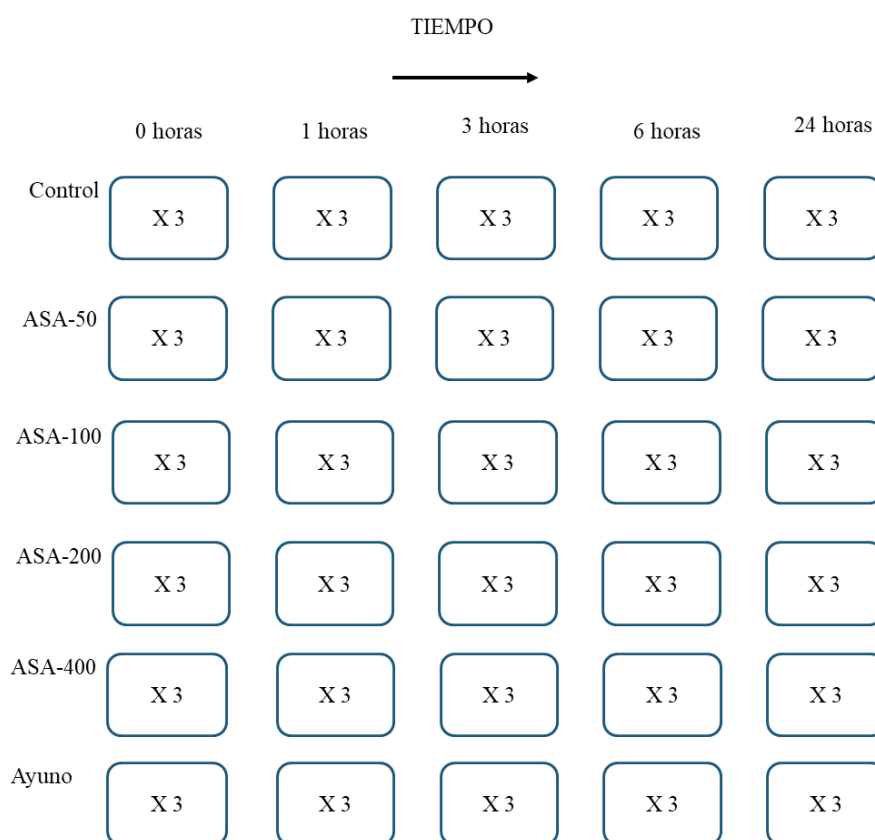


Figura 14. Diseño experimental del bioensayo 2 (Dosis ASA). X3 = tres réplicas por tratamiento. 1 tiempo x 3 réplicas x 4 organismos/ réplica=12 camarones x 5 tiempos= 60 camarones/tratamiento x 6 tratamientos = 360 organismos totales.



Figura 15. Bolsitas usadas para evitar que fuera ingerido el alimento en el tiempo cero.

Para los muestreos del tiempo cero, se pusieron 0.7g de cada alimento dentro de bolsitas de tela tipo tul de nylon y cerradas con costura (Figura 15), mismas que se colocaron dentro de los acuarios durante 5 min para que el ASA se lixiviera en el agua y ver si había asimilación a través de las branquias, pero evitando que el alimento fuera ingerido por los camarones.

Los muestreos consistieron en tomar dos camarones de cada acuario y eutanasiarlos en nitrógeno líquido, hasta completar los organismos de los cinco alimentos, y finalmente preservarlos en bolsas que se guardaron a -80°C para los análisis de lípidos. A los otros dos camarones restantes de cada acuario se les extrajo hemolinfa con una jeringa de 3 ml y aguja 22G \times 32mm previamente cargada con 0.2 mL de una solución de oxalato de sodio (concentración 0.05g/ mL) como anticoagulante, y se colocó en tubos Eppendorf de 1 mL. Las muestras de hemolinfa fueron utilizadas para análisis de salicilatos, mientras que los camarones fueron usados para un estudio histológico (Figura 16). Una vez completadas todas las muestras de hemolinfa de los cinco tratamientos, se congelaron a -80°C .

6.2.4 Análisis histológico

Después de haber tomado las muestras de hemolinfa, se realizaron disecciones de los dos organismos restantes en el acuario, donde, con la ayuda de un bisturí, se separaron el cefalotórax junto con el primer segmento del músculo abdominal del resto de la cola: el primer organismo cortado se sumergió en una solución de Davison y el segundo en una

solución de paraformaldehído para la técnica de TUNEL la cual se describe en el inciso 6.2.5. Los tejidos cortados y fijados en solución Davison (12% glicerina, 22% de formaldehído 37-40%, 33% de etanol 95°C, 33% de agua de mar filtrada, y 1/9 (v/v) de ácido acético añadido justo antes de su uso) y paraformaldehído al 4% diluido en agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato), fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol (70% a 100%), aclarados con xileno, y embebidos en parafina.



1. Congelación de camarones en nitrógeno líquido



2. Toma de hemolinfa



3. Disección de organismos



4. Fijación para histología

Figura 16. Toma de muestras de camarón durante el muestreo del bioensayo 2 (Dosis-ASA).

Se realizaron cortes de la glándula digestiva, branquias y músculo, se metieron dentro de los casetes para histología y se volvieron a embeber en parafina para después ser hacer los cortes histológicos de 4 μm de espesor en un micrótopo de rotación (LIECA RM 2025), montados en portaobjetos de vidrio, teñidos con Hematoxilina de Harris-eosina y montados en resina con cubreobjetos. Las laminillas fueron examinadas con un microscopio óptico compuesto (OLYMPUS BX 41, Cámara NIKON) a 10X, 20X y 40X, y se midió el área tubular de la glándula digestiva, ancho de branquias y células B y R con el programa Image Pro Plus 6.0.

6.2.5 Apoptosis celular mediante la detección de la fragmentación del ADN

Después de haber sumergido en solución Davison segmento del músculo abdominal del primer organismo, Se cortó cefalotórax junto con el primer segmento del músculo abdominal del segundo organismo de cada acuario de todos los tratamientos y se fijaron en paraformaldehído para después hacer TUNEL para fraccionamiento de DNA (apoptosis). TUNEL es un método para la detección fragmentos de ADN que resulta de la cascada de señalización de muerte celular por apoptosis. El ensayo se basa en la presencia de fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb), que pueden ser identificados por desoxinucleotidil transferasa terminal o TdT, una enzima que cataliza la adición de dUTPs que se marcan secundariamente con un marcador fluorescente (Schmitz *et al.*, 1991, Gavrieli *et al.*, 1992). Se utilizó el kit de detección *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche) para demostrar la cadena fragmentada de ADN en las células apoptóticas, mediante el etiquetado de las fracciones de ADN con marcador fluorescente de la terminal transferasa nucleótidos trifosfato desoxiuridina F-dUTP (TUNEL). La semicuantificación se hizo con base a la asignación dada por Lightner (1996) y modificada por Rodríguez-Jaramillo (2014), que consiste en darle un valor numérico cualitativo al nivel de daños y/o alteraciones en branquias, músculo, tejido conjuntivo, glándula digestiva, tejido liposo de los camarones juveniles, de acuerdo al grado de afectación; donde 0 = No presenta alteraciones en los tejidos; 1 = Presencia mínima de alteraciones en los tejidos; 2 =

Presencia media de alteraciones en los tejidos y 3 = Presencia alta de alteraciones en los tejidos.

6.2.6 Determinación de PGEM

La determinación de PGEM se hizo como se describe en el inciso 6.1.7.5

6.2.7 Análisis estadísticos

Se realizó ANOVA bifactorial entre tratamientos, considerando los cinco tiempos de muestreo y los cinco alimentos como variables independientes. Cuando se encontró una diferencia significativa ($P < 0.05$), las medias se compararon usando un análisis post-hoc (Tukey). Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software STATISTICATM 6.3 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

6.3. Evaluación del efecto de un inhibidor de ciclooxigenasas sobre la producción de prostaglandinas y la supervivencia en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.

6.3.1 Origen de los organismos

Al final del bioensayo de crecimiento del objetivo 1, se tomaron juveniles de camarón con un peso promedio de 12.0 g que fueron utilizados el reto de estrés que se describe en el inciso 6.3.3.

6.3.2. Fabricación de alimentos experimentales

El alimento Control utilizado en el bioensayo de crecimiento del objetivo 1 (Tabla VIII) se quebró en un molino de carne $\frac{3}{4}$ -HP (TOR-REY, Monterrey, NL, México) con una criba de $\frac{1}{4}$ de pulgada y se pulverizó en un molinillo de café (premezcla pulverizada). Esta premezcla se dividió en dos partes para producir dos alimentos: un alimento Control, compuesto de premezcla pulverizada al 93%, harina de calamar al 5% (atractante) y alginato de sodio al 2% (ligante), y un alimento ASA, compuesto de premezcla pulverizada al 91.8% harina de calamar al 5%, alginato de sodio al 2%, y ácido acetilsalicílico (farmacias similares S.A de C.V.) como inhibidor de la COX al 1.2% (0.1 mg de ASA/g de camarón) según los cálculos basados en Van Anholt *et al.* (2004) para *Sparus aurata*. Los alimentos fueron mezclados en una batidora vertical con capacidad de 1.5 L (Kitchen Aid^{MR}, profesional 600) durante un período de 5 minutos, se añadió ~35% de agua y se mezcló durante 10 minutos más para lograr una consistencia adecuada. La masa se extruyó en un molino de carne de $\frac{3}{4}$ HP (TOR-REY, Monterrey, NL, México) a través de una criba de 2 mm, como se describe en Civera y Guillaume (1989). Los pellets se secaron en un horno de flujo horizontal a 60°C durante 2 horas hasta que el contenido de humedad fue inferior al 14% y se almacenaron en bolsas de plástico a 4 °C hasta su uso.

6.3.2.1 Análisis químico proximal

Se tomó muestra de cada alimento para hacer análisis de composición proximal en el laboratorio de Análisis Químicos Proximales del CIBNOR como se describe en el inciso 6.1.1.1. En la Tabla XI se muestra la composición en ingredientes y proximal de los alimentos.

Tabla XI. Composición en ingredientes, proximal y de energía de los alimentos utilizados en el bioensayo 3, de producción de prostaglandinas E₂, en presencia o no de inhibidor de COX.

| Alimento (g/100g) | Control | ASA |
|--|---------------|---------------|
| Ácido acetilsalicílico ¹ | ---- | 1.20 |
| Premezcla pulverizada ² | 9.30 | 9.18 |
| Harina de calamar ³ | 5.00 | 5.00 |
| Ácido algínico ⁴ | 2.00 | 2.00 |
| Composición proximal (g/100 g de materia seca, excepto humedad) | | |
| Humedad | 8.15±0.00 | 8.06±0.01 |
| Proteína cruda | 37.80±0.06 | 37.35±0.06 |
| Extracto etéreo | 8.98±0.03 | 8.87±0.03 |
| Fibra cruda | 1.00±0.03 | 1.00±0.03 |
| Cenizas | 9.24±0.05 | 9.13±0.05 |
| Extracto libre de nitrógeno ⁵ | 42.99±0.08 | 43.66±0.09 |
| Energía bruta (cal/g) | 4,722.63±2.99 | 4,665.75±2.95 |

Medias ± error estándar

¹ Farmacias similares

² Premezcla pulverizada, misma composición a la del alimento Control en la Tabla VIII.

³ Harina preparada en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR.

⁴ Sigma Chemical Co. ST. Louis, MO, USA.

⁵ Extracto libre de nitrógeno= 100-(% humedad + % proteína cruda + % fibra+ % ceniza + % extracto etereo).

6.3.3 Reto de estrés

Camarones juveniles (n = 90, peso promedio de 12 g) se distribuyeron en seis tanques de fibra de vidrio de 600 L a una densidad de 15 camarones por tanque, se dejaron en ayunas durante la noche, luego se alimentaron con el alimento Control y el alimento ASA por una hora. Se capturaron con una red 5 organismos de cada tanque, se eutanasiaron en nitrógeno líquido y posteriormente, se conservaron a -80 °C en bolsas etiquetadas; estos camarones correspondieron al grupo Sin Estrés (SE). El resto de los camarones (10

camarones en estadio de intermuda C por tanque, 3 tanques por tratamiento) correspondieron al grupo con Estrés (E). Estos camarones se colocaron individualmente en cubetas de 20 L sin agua, se dejaron expuestos al aire por 15 minutos, y después se regresaron a los tanques con agua de mar y aireación durante 30 minutos (tiempo de recuperación) (Figura 17). Al cabo de este tiempo, se registró la presencia de coloración blanca en el músculo de los camarones, así como los camarones muertos. Posteriormente, se eutanasiaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta sus análisis.

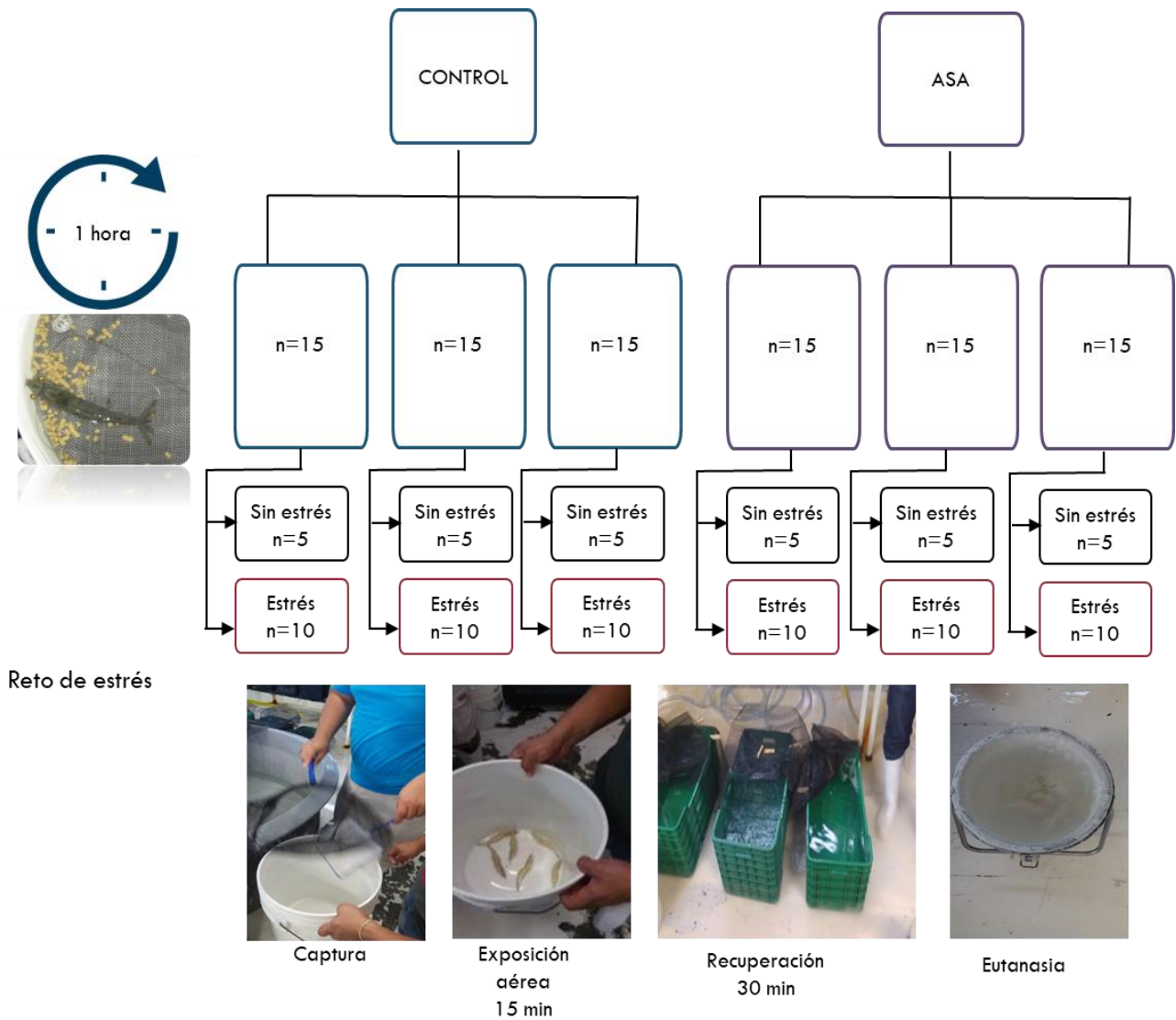


Figura 17. Diseño experimental para el reto de estrés con ASA.

6.3.4 Análisis bioquímico

Se diseccionaron hepatopáncreas de camarón y se tomó 0.1g de muestras de para medir los niveles de proteína total, lípidos totales, carbohidratos totales, glucosa y lactato. Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR, por espectrofotometría en un lector de microplaca (Multiskan spectrum, Thermo Fisher Scientific) a 495 nm para carbohidratos totales, a 595 nm para proteínas totales, 540 nm para lactato, glucosa y lípidos totales como se describe en Robles-Romo *et al.* (2016).

6.3.5 Análisis de lípidos

Se disectaron camarones sobre una placa de hielo para obtener muestras de branquias. Se pesaron 100 mg de branquias y se realizó la extracción de lípidos tal como se describe en Palacios *et al.* (2005). Se usó una alícuota de extracto de hepatopáncreas, 6 alícuotas de extracto de branquias y una alícuota de extracto de alimento para determinar FAME totales. Los ácidos grasos ésteres metílicos se analizaron en cromatografía de gases (G890N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) Con columna de sílice DB-23 (30 mx 0.25 mm DI x 0.25 mm de espesor de película) con helio como gas portador, una rampa de temperatura de 110 a 220°C y detector de ionización de llama. Los ácidos grasos se identificaron comparando sus tiempos de retención con los de los estándares.

6.3.6 Determinación de PGEM.

La determinación de PGEM se hizo en branquias como se describe en la sección 6.1.7.5

6.3.7 Determinación de hidroperóxidos (LOOH).

El contenido de LOOH en branquias se realizó a partir del extracto de cloroformo-metanol (2:1 v/v) por el método de tiocianato férrico como se describe en Zamora *et al.*

(2017). Se filtraron 10 mL extracto lipídico, se evaporaron con nitrógeno gaseoso hasta 1 mL, y posteriormente las muestras se diluyeron 1:50 con solución Folch. Se tomaron 500 μ L del extracto diluido y se agregaron 500 μ L de metanol, 25 μ L de tiocianato de amonio al 30% en metanol y 25 μ L de cloruro ferroso en agua desionizada. Todos los solventes y soluciones se burbujearon con nitrógeno gaseoso para eliminar el oxígeno presente; la reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y se leyó a una absorbancia de 505 nm en un lector de microplacas (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) usando una curva estándar de hidroperóxido de cumeno (Sigma-Aldrich).

6.3.8 Análisis estadísticos

Se realizaron ANOVA bifactoriales considerando el estrés (dos niveles: no estresado y estresado) y ASA (dos niveles: alimento de Control y alimento ASA) como variables independientes. Cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), las medias se compararon usando análisis post-hoc (Tukey). Se realizó un análisis de correlación multivariante (PCA) entre las variables seleccionadas analizadas en los camarones. Todos los datos se analizaron estadísticamente utilizando el software STATISTICATM 6.3 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación del efecto de alimentos que contienen subproductos marinos sobre la producción de lípidos bioactivos en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.

7.1.1 Parámetros zootécnicos

En la Tabla XII se muestran los parámetros zootécnicos obtenidos durante el bioensayo de crecimiento. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto el peso final, donde los organismos del tratamiento calamar tuvieron el peso mayor y los organismos del tratamiento del tratamiento Control el menor peso final. Se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento, donde los organismos del tratamiento calamar tuvieron mayor tasa de crecimiento y los organismos del tratamiento Control la menor tasa.

Tabla XII. Parámetros zootécnicos por tratamiento durante el bioensayo de crecimiento.

| | Control | Catarina | Calamar | P |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----|
| Peso Inicial (g) | 1.50 ± 0.02 | 1.48 ± 0.02 | 1.49 ± 0.01 | NS |
| Peso Final (g) | 11.78 ^a ± 0.27 | 12.63 ^b ± 0.08 | 15.67 ^c ± 0.49 | * |
| Supervivencia (%) | 95.56 ± 7.70 | 97.78 ± 3.85 | 100.00 ± 0.00 | NS |
| Tasa de crecimiento (%) | 686.7 ^a ± 19.12 | 753.0 ^b ± 304.9 | 948.4 ^c ± 335.6 | * |
| Mudas totales promedio | 31.67 ± 4.16 | 38.33 ± 11.06 | 40.67 ± 6.81 | NS |
| Alimento consumido aparente (g/organismo/día) | 0.35 ^a ± 0.03 | 0.34 ± 0.25 ^a | 0.66 ^b ± 0.27 | * |
| F.C.A. | 1.98 ^a ± 0.09 | 1.77 ^a ± 0.05 | 2.81 ^b ± 0.28 | * |

F.C.A. = Factor de conversión alimenticia. Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

En cuanto al alimento consumido aparente los organismos del tratamiento calamar comieron significativamente más alimento que los organismos de los otros tratamientos: de

igual forma, el factor de conversión alimenticia fue significativamente mayor con este tratamiento que con los otros dos tratamientos.

No se detectaron diferencias significativas en la supervivencia entre tratamientos; en todos se observaron tasas de supervivencia por arriba del 95%.

7.1.2 Alimentos

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto el porcentaje y concentración en la mayoría de las clases de lípidos en los alimentos, excepto por ésteres de esteroides, donde se observó mayor concentración y mayor porcentaje en el alimento Control, mientras que los alimentos Catarina y calamar tuvieron los valores más bajos. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de carotenoides totales de los alimentos (Tabla XIII).

Tabla XIII. Composición proximal, de energía bruta, estabilidad en el agua, clases de lípidos y carotenoides totales de los alimentos para camarón.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | P |
|--|---------|---------------------|----------|---------------------|---------|----------------------|----|
| Composición proximal (g/100 de materia seca, excepto humedad) | | | | | | | |
| Humedad | 8.00 | ± 0.00 ^b | 6.46 | ± 0.00 ^a | 9.40 | ± 0.05 ^c | * |
| Proteína | 37.23 | ± 0.11 ^c | 35.66 | ± 0.11 ^a | 36.00 | ± 0.12 ^b | * |
| Extacto etéreo | 9.09 | ± 0.04 ^a | 9.82 | ± 0.11 ^b | 9.74 | ± 0.13 ^b | NS |
| Fibra cruda | 1.03 | ± 0.05 | 0.93 | ± 0.05 | 0.93 | ± 0.05 | NS |
| Cenizas | 8.79 | ± 0.09 ^a | 8.94 | ± 0.03 ^b | 9.07 | ± 0.03 ^b | * |
| ELN | 43.84 | ± 0.16 | 44.63 | ± 0.26 | 44.25 | ± 0.25 | NS |
| Energía (cal/g) | 4739.95 | ± 5.38 ^c | 4718.38 | ± 2.92 ^a | 4730.38 | ± 4.63 ^{ab} | * |
| Estabilidad en agua | 90.4 | ± 0.3 ^{ab} | 91.5 | ± 0.3 ^b | 88.8 | ± 0.8 ^a | * |
| Concentración (mg/100g) | | | | | | | |
| Ésteres de esteroides | 7.33 | ± 1.32 ^b | 3.24 | ± 0.40 ^a | 2.97 | ± 1.01 ^a | * |
| Triacilglicéridos | 15.93 | ± 9.31 | 17.94 | ± 5.85 | 6.50 | ± 3.49 | NS |
| Esteroides | 8.30 | ± 2.18 | 10.90 | ± 3.03 | 4.99 | ± 1.48 | NS |
| Diglicéridos | 2.45 | ± 1.24 | 1.99 | ± 0.57 | 2.30 | ± 0.36 | NS |
| Monoglicéridos | 1.59 | ± 0.54 | 1.39 | ± 0.13 | 2.13 | ± 0.43 | NS |
| Fosfolípidos | 70.67 | ± 14.42 | 65.32 | ± 8.36 | 78.40 | ± 7.76 | NS |
| Carotenoides totales (mg/100g) | 62.38 | ± 22.54 | 46.54 | ± 27.17 | 54.38 | ± 43.05 | NS |

Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de ácidos grasos totales entre los alimentos experimentales (Tabla XIV). Todos los ácidos grasos fueron significativamente diferentes entre los alimentos, con mayor proporción de 16:0 en el alimento calamar (18.6%), y menor los otros dos alimentos. El 18:2n-6 presentó valores altos en los alimentos Control y Catarina con 21%, mientras que el alimento calamar presentó el valor más bajo. El ARA fue más alto en el alimento Catarina (1.4%); El alimento Control presentó el valor intermedio de 0.9% y el alimento calamar el valor más bajo. El 20:5n-3 tuvo el valor más alto en los alimentos Control y Catarina con 8.0% y 7.5% respectivamente, en contraste con el alimento rico en colesterol el cual tuvo el valor de 5.0%. El 22:6n-3 se encontró más alto en los alimentos Control y Catarina, ambos con 12.3%; el menor valor en el alimento calamar con 7.2%.

Tabla XIV. Ácidos grasos totales en los alimentos experimentales usados en el bioensayo de crecimiento (% del total de ácidos grasos totales).

| | Control | Catarina | Calamar | P |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----|
| 14:0 | 2.2 ± 0.0 ^a | 2.0 ± 0.0 ^a | 3.5 ± 0.2 ^b | * |
| 16:0 | 15.0 ± 0.1 ^a | 14.3 ± 0.0 ^a | 18.6 ± 0.9 ^b | * |
| 18:0 | 4.0 ± 0.0 ^a | 4.0 ± 0.0 ^a | 5.1 ± 0.2 ^b | * |
| 16:1n-7 | 3.3 ± 0.0 ^a | 4.4 ± 0.1 ^c | 3.6 ± 0.0 ^b | * |
| 18:1n-9 | 15.5 ± 0.1 | 15.6 ± 0.4 | 15.7 ± 0.2 | NS |
| 18:1n-7 | 2.6 ± 0.0 ^a | 2.8 ± 0.1 ^b | 2.6 ± 0.0 ^a | * |
| 20:1n-9 | 2.6 ± 0.0 ^c | 1.8 ± 0.1 ^b | 1.5 ± 0.1 ^a | * |
| 18:2n-6 | 21.4 ± 0.0 ^b | 19.9 ± 0.2 ^a | 21.3 ± 0.1 ^b | * |
| 18:3n-3 | 3.3 ± 0.0 ^b | 3.5 ± 0.0 ^b | 3.0 ± 0.1 ^a | * |
| 20:4n-6 | 1.0 ± 0.0 ^b | 1.1 ± 0.0 ^c | 0.7 ± 0.0 ^a | * |
| 20:5n-3 | 8.0 ± 0.0 ^b | 7.6 ± 0.1 ^b | 5.0 ± 0.5 ^a | * |
| 22:6n-3 | 12.4 ± 0.3 ^b | 12.4 ± 0.2 ^b | 7.3 ± 0.8 ^a | * |
| Σ SAT | 22.4 ± 0.1 ^a | 21.6 ± 0.0 ^a | 29.1 ± 1.2 ^b | * |
| Σ MUFA | 27.3 ± 0.4 ^a | 28.1 ± 0.3 ^a | 31.1 ± 0.8 ^b | * |
| Σ PUFA | 49.7 ± 0.5 ^b | 49.7 ± 0.3 ^b | 39.1 ± 2.0 ^a | * |
| Σ HUFA | 24.2 ± 0.4 ^b | 23.7 ± 0.3 ^b | 15.0 ± 1.5 ^a | * |
| n-3/n-6 | 0.80 ± 0.01 ^b | 0.74 ± 0.01 ^b | 0.52 ± 0.04 ^a | * |

Σ SAT: suma de ácidos grasos saturados, Σ MUFA: suma de ácidos grasos monoinsaturados, Σ PUFA: suma de ácidos grasos poliinsaturados, Σ HUFA: ácidos grasos altamente insaturados, n-6/n-3: relación n-6/n-3. Se aplicó un ANOVA unifactorial entre alimentos ($P < 0.05$). Cuando hubo una diferencia significativa, se aplicó una prueba de Post-hoc Tukey. Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

En cuanto a los esteroides totales en los alimentos experimentales, solo se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de brasicasterol, campesterol y β -sitosterol entre los tratamientos, donde los alimentos Control y Catarina tuvieron los porcentajes más bajos (0.69% y 0.46%) de brasicasterol, mientras que el alimento con harina de calamar el porcentaje más alto (1.4%). El porcentaje de campesterol mostró un comportamiento similar: bajo porcentaje en Catarina y Control, mientras que en calamar el más alto (0.51%, 0.61% y 1.41%) y β -sitosterol se encontró bajo en el alimento con Catarina (2.99%), seguido del control (3.46%) y con el valor más alto en alimento con calamar (4.11%) (Tabla XV).

Tabla XV. Esteroides totales (% del total de esteroides) en los alimentos experimentales.

| Esteroides (%) | Control | Catarina | Calamar | P |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----|
| Dihidrocolesterol | 9.1 \pm 3.0 | 9.4 \pm 0.8 | 7.7 \pm 1.3 | NS |
| Colesterol | 85.8 \pm 2.6 | 86.3 \pm 1.0 | 85.0 \pm 1.5 | NS |
| Brasicasterol | 0.7 \pm 0.3 ^a | 0.5 \pm 0.1 ^a | 1.4 \pm 0.2 ^b | * |
| Campesterol | 0.6 \pm 0.1 ^a | 0.5 \pm 0.1 ^{ab} | 1.4 \pm 0.1 ^c | * |
| Estigmasterol | 0.3 \pm 0.2 | 0.2 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.1 | NS |
| β -sitosterol | 3.5 \pm 0.6 ^a | 3.0 \pm 0.6 ^a | 4.1 \pm 0.3 ^b | * |

Medias \pm error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

7.1.3 Camarones

El estrés aplicado al final del bioensayo provocó una supervivencia significativamente menor en los camarones alimentados con el alimento Control (Figura 18). No hubo diferencias significativas en la coloración blanca (opaca) que algunos camarones desarrollaron después del estrés (Figura 19). Sí hubo diferencias significativas en la respuesta post-estrés (nado errático ó acalambrados), donde los camarones del tratamiento Control tuvieron la menor respuesta, seguidos de aquellos del tratamiento Calamar y los que mejor respondieron después del reto fueron los del tratamiento Catarina (Figura 20).

En la fracción de acilglicéridos, no se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de 14:0, 16:1n-7, 18:3n-3. Los ácidos grasos 22:6n-3 y 20:5n-3 no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí el ARA en cuanto al tipo de

tratamiento independientemente del estrés aplicado, donde los camarones del tratamiento Calamar presentaron los mayores porcentajes, los camarones del tratamiento Control tuvieron el porcentaje intermedio y los del tratamiento Catarina el menor porcentaje (Figura 21, Tabla XVI).

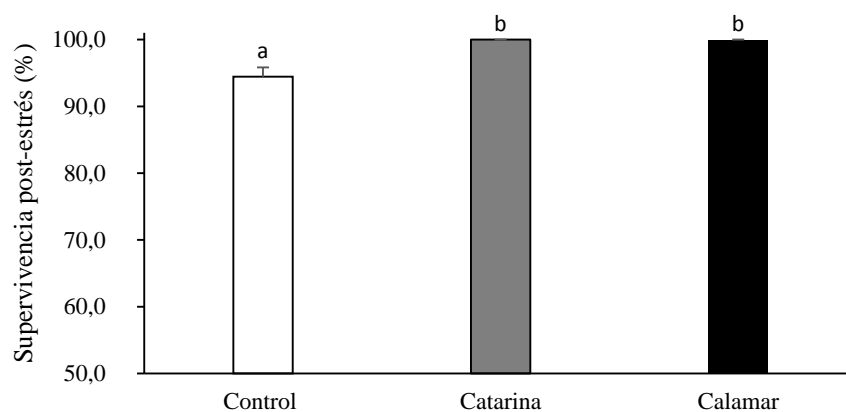


Figura 18. Supervivencia (%) después del reto de estrés por manipulación y exposición aérea de camarones alimentados con los alimentos experimentales, medias \pm error estándar, letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

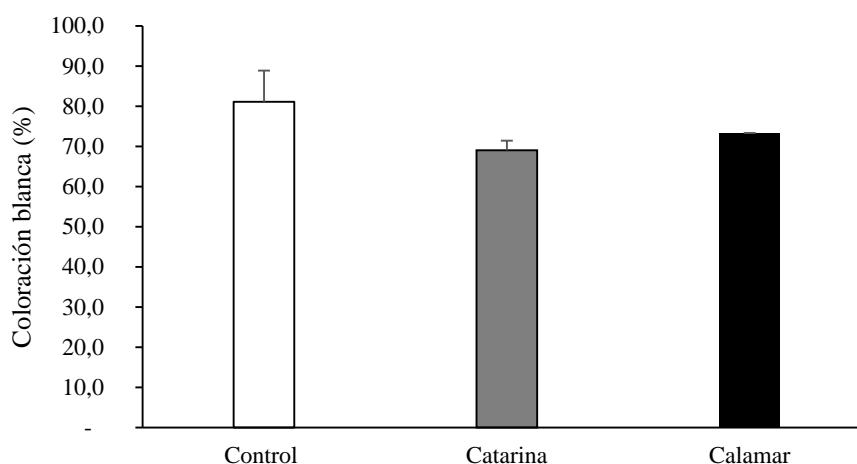


Figura 19. Coloración blanca (%) después del reto de estrés por manipulación y exposición aérea de camarones alimentados con los alimentos experimentales, medias \pm error estándar, letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

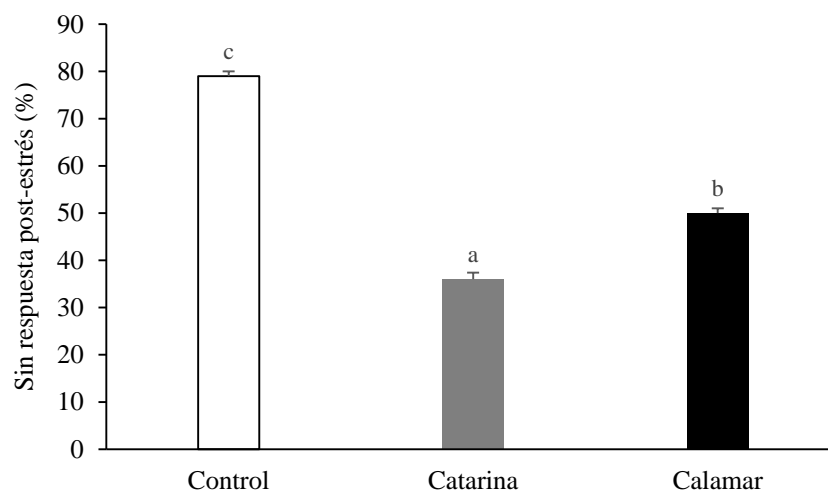


Figura 20. Camarones alimentados con los alimentos experimentales, que no presentaron ninguna respuesta post-estrés (condiciones de nado errático y acalambrados) después de estimulación mecánica con varilla, medias \pm error estándar. Letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

En cuanto al porcentaje de ácidos grasos en la fracción de fosfolípidos, solo se observaron diferencias significativas en 16:0 y sumatoria de n-6. Respecto al 16:0, el tratamiento Control sin estrés tuvo el porcentaje más bajo (13.5%), seguido del tratamiento Catarina con estrés, Control con estrés y Catarina sin estrés (14.3, 14.6, 14.9 y 15.2%), mientras que el tratamiento Calamar tuvo el porcentaje más alto (15.6%); respecto a la sumatoria de n-6 se encontró que el tratamiento Control con estrés tuvo el porcentaje más bajo (15%), seguido de los tratamientos Control sin estrés (15.7%), Calamar sin estrés y con estrés (16.3 y 16.9%) y Catarina sin estrés el mayor porcentaje (16.9%). No se detectaron diferencias significativas en el contenido de ARA entre tratamientos (Figura 22) (Tabla XVII).

Tabla XVI. Ácidos grasos totales (% del total de ácidos grasos) en la fracción de acilglicéridos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | P | | |
|-----------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | A | E | AxE |
| 14:0 | 0.2 ± 0.4 ^a | 0.2 ± 0.1 ^a | 0.3 ± 0.1 ^{ab} | 0.2 ± 0.0 ^{ab} | 0.3 ± 0.1 ^{ab} | 0.3 ± 0.1 ^c | * | NS | NS |
| 16:0 | 13.2 ± 2.1 | 12.1 ± 0.5 | 12.1 ± 0.5 | 12.0 ± 0.3 | 11.9 ± 2.6 | 11.8 ± 1.7 | NS | NS | NS |
| 18:0 | 10.6 ± 5.0 | 7.6 ± 0.7 | 8.8 ± 1.0 | 8.8 ± 0.3 | 10.7 ± 4.6 | 9.9 ± 3.7 | NS | NS | NS |
| 16:1n-9 | 1.1 ± 0.1 ^b | 1.0 ± 0.0 ^{ab} | 0.8 ± 0.0 ^{ab} | 1.0 ± 0.0 ^{ab} | 0.7 ± 0.0 ^a | 0.9 ± 0.0 ^{ab} | * | NS | NS |
| 16:1n-7 | 0.8 ± 0.0 ^{ab} | 0.8 ± 0.0 ^{abc} | 1.0 ± 0.0 ^c | 1.0 ± 0.0 ^{bc} | 0.7 ± 0.2 ^a | 0.7 ± 0.0 ^a | * | NS | NS |
| 18:1n-9 | 11.7 ± 0.5 ^a | 12.2 ± 0.3 ^{abc} | 12.0 ± 0.6 ^{ab} | 12.0 ± 0.1 ^{ab} | 12.8 ± 0.6 ^{bc} | 13.1 ± 0.8 ^c | * | NS | NS |
| 18:1n-7 | 3.8 ± 0.6 | 3.5 ± 0.2 | 3.3 ± 0.2 | 3.3 ± 0.0 | 3.5 ± 0.2 | 3.7 ± 0.9 | NS | NS | NS |
| 18:2n-6 | 10.2 ± 0.7 ^a | 10.3 ± 0.5 ^a | 12.5 ± 0.4 ^b | 12.6 ± 0.4 ^b | 11.4 ± 0.4 ^a | 11.0 ± 1.2 ^a | * | NS | NS |
| 18:3n-3 | 0.9 ± 0.1 ^a | 0.8 ± 0.1 ^a | 0.9 ± 0.1 ^b | 0.9 ± 0.0 ^b | 0.7 ± 0.2 ^a | 0.8 ± 0.1 ^a | * | NS | NS |
| 18:4n-3 | 1.8 ± 1.0 | 0.3 ± 0.0 | 0.5 ± 0.1 | 0.4 ± 0.1 | 0.7 ± 0.2 | 1.7 ± 1.3 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 3.3 ± 0.8 ^{abc} | 2.9 ± 0.2 ^a | 3.1 ± 0.3 ^{ab} | 3.0 ± 0.1 ^{ab} | 4.3 ± 0.8 ^c | 4.1 ± 1.1 ^{bc} | * | NS | NS |
| 20:5n-3 | 14.6 ± 4.5 | 17.4 ± 1.0 | 17.9 ± 1.6 | 19.0 ± 0.6 | 16.8 ± 4.1 | 16.3 ± 3.7 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 18.6 ± 5.4 | 22.6 ± 0.7 | 22.2 ± 1.2 | 21.6 ± 0.7 | 23.3 ± 5.6 | 22.5 ± 5.9 | NS | NS | NS |
| Σ SAT | 25.9 ± 7.6 | 21.2 ± 0.9 | 22.5 ± 0.5 | 22.3 ± 0.3 | 24.2 ± 7.4 | 23.5 ± 5.4 | NS | NS | NS |
| Σ MUFA | 21.3 ± 4.5 | 19.5 ± 1.1 | 18.0 ± 2.2 | 17.4 ± 0.4 | 18.4 ± 3.6 | 19.3 ± 5.3 | NS | NS | NS |
| Σ PUFA | 50.3 ± 11.0 | 56.7 ± 1.2 | 57.0 ± 2.1 | 57.8 ± 0.7 | 55.7 ± 10.6 | 55.3 ± 10.4 | NS | NS | NS |
| Σ HUFA | 37.8 ± 9.2 | 43.8 ± 1.5 | 44.2 ± 2.7 | 44.5 ± 0.7 | 45.2 ± 8.9 | 44.1 ± 8.8 | NS | NS | NS |
| Σ n-6 | 14.7 ± 2.3 | 15.1 ± 0.7 | 15.2 ± 0.6 | 15.5 ± 0.4 | 14.1 ± 1.1 | 14.6 ± 1.4 | NS | NS | NS |
| Σ n-3 | 35.6 ± 9.4 | 41.6 ± 1.5 | 41.8 ± 2.5 | 42.2 ± 0.8 | 41.5 ± 9.6 | 40.7 ± 9.2 | NS | NS | NS |
| n-3/n-6 | 2.41 ± 0.53 | 2.76 ± 0.21 | 2.76 ± 0.25 | 2.72 ± 0.09 | 2.91 ± 0.54 | 2.76 ± 0.51 | NS | NS | NS |
| 22:6/20:5 | 1.29 ± 0.14 | 1.30 ± 0.06 | 1.24 ± 0.06 | 1.14 ± 0.05 | 1.39 ± 0.05 | 1.36 ± 0.11 | * | NS | NS |
| 20:4/20:5 | 0.29 ± 0.27 | 0.17 ± 0.02 | 0.17 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 | 0.29 ± 0.18 | 0.28 ± 0.20 | NS | NS | NS |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

Tabla XVII. Ácidos grasos totales (% del total de ácidos grasos) en la fracción de fosfolípidos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | A | P | E | AxE |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|----|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | | | | |
| 14:0 | 0.2 ± 0.1 | 0.2 ± 0.0 | 0.3 ± 0.0 | 0.2 ± 0.1 | 0.3 ± 0.1 | 0.3 ± 0.1 | * | NS | NS | |
| 16:0 | 13.5 ± 0.8 ^a | 14.6 ± 0.5 ^b | 14.9 ± 0.6 ^b | 14.7 ± 0.5 ^b | 15.7 ± 0.7 ^b | 15.3 ± 0.6 ^b | * | NS | * | |
| 18:0 | 9.5 ± 0.5 ^b | 9.6 ± 0.3 ^b | 9.7 ± 0.4 ^b | 9.9 ± 0.4 ^b | 8.9 ± 0.4 ^a | 9.9 ± 1.0 ^b | NS | * | * | |
| 16:1n-9 | 0.9 ± 0.2 ^b | 0.8 ± 0.1 ^b | 0.8 ± 0.1 ^{ab} | 0.8 ± 0.1 ^b | 0.5 ± 0.1 ^a | 0.6 ± 0.2 ^{ab} | * | NS | NS | |
| 16:1n-7 | 0.7 ± 0.06 ^{ab} | 0.8 ± 0.06 ^{abc} | 0.9 ± 0.0 ^c | 0.9 ± 0.0 ^{bc} | 0.7 ± 0.1 ^a | 0.7 ± 0.0 ^a | * | NS | NS | |
| 18:1n-9 | 11.7 ± 0.5 ^a | 12.2 ± 0.2 ^{abc} | 12.0 ± 0.6 ^{ab} | 12.0 ± 0.1 ^{ab} | 12.8 ± 0.6 ^{bc} | 13.1 ± 0.8 ^c | * | NS | NS | |
| 18:1n-7 | 3.8 ± 0.6 | 3.5 ± 0.2 | 3.3 ± 0.2 | 3.3 ± 0.0 | 3.5 ± 0.2 | 3.7 ± 0.8 | NS | NS | NS | |
| 18:2n-6 | 10.2 ± 0.7 ^a | 10.3 ± 0.5 ^a | 12.5 ± 0.5 ^b | 12.7 ± 0.5 ^b | 11.3 ± 0.4 ^a | 11.6 ± 1.2 ^a | * | NS | NS | |
| 18:3n-3 | 0.8 ± 0.1 ^a | 0.8 ± 0.1 ^a | 1.1 ± 0.1 ^b | 1.1 ± 0.0 ^b | 0.9 ± 0.1 ^a | 0.9 ± 0.1 ^a | * | NS | NS | |
| 20:4n-6 | 3.0 ± 1.0 | 2.4 ± 0.1 | 2.1 ± 0.3 | 2.1 ± 0.2 | 2.3 ± 0.1 | 3.0 ± 1.3 | NS | NS | NS | |
| 20:5n-3 | 15.2 ± 1.3 ^{bc} | 15.9 ± 0.3 ^c | 14.4 ± 0.5 ^{abc} | 14.4 ± 0.6 ^{bc} | 13.4 ± 0.9 ^{ab} | 12.2 ± 2.4 ^a | * | NS | NS | |
| 22:6n-3 | 19.8 ± 1.8 | 19.9 ± 0.8 | 18.4 ± 0.3 | 18.0 ± 0.7 | 20.1 ± 1.0 | 18.2 ± 3.9 | NS | NS | NS | |
| Σ SAT | 24.5 ± 1.1 ^a | 25.7 ± 0.9 ^{ab} | 26.1 ± 0.6 ^{ab} | 26.2 ± 0.6 ^{ab} | 26.3 ± 1.0 ^b | 27.0 ± 1.7 ^b | * | * | NS | |
| Σ MUFA | 20.6 ± 2.1 | 20.0 ± 0.3 | 20.0 ± 0.6 | 20.0 ± 0.6 | 20.6 ± 0.9 | 21.9 ± 3.4 | NS | NS | NS | |
| Σ PUFA | 52.6 ± 2.0 | 52.3 ± 0.7 | 51.7 ± 0.7 | 51.6 ± 0.7 | 51.3 ± 1.5 | 49.0 ± 5.6 | NS | NS | NS | |
| Σ HUFA | 39.2 ± 2.0 ^b | 39.0 ± 0.6 ^b | 35.7 ± 1.0 ^{ab} | 35.4 ± 1.0 ^{ab} | 36.4 ± 1.8 ^{ab} | 34.3 ± 4.9 ^a | * | NS | NS | |
| Σ n-6 | 15.8 ± 0.7 ^{ab} | 14.9 ± 0.4 ^a | 17.1 ± 0.3 ^c | 17.2 ± 0.4 ^c | 16.3 ± 0.4 ^{bc} | 16.7 ± 0.8 ^c | * | NS | * | |
| Σ n-3 | 36.9 ± 2.5 ^a | 37.3 ± 0.5 ^b | 34.5 ± 0.7 ^{ab} | 34.4 ± 0.9 ^{ab} | 35.0 ± 1.7 ^{ab} | 32.3 ± 6.0 ^a | * | NS | NS | |
| n-3/n-6 | 2.35 ± 0.25 ^{bc} | 2.50 ± 0.08 ^c | 2.02 ± 0.06 ^{ab} | 1.99 ± 0.09 ^{ab} | 2.15 ± 0.15 ^{abc} | 1.94 ± 0.42 ^a | * | NS | NS | |
| 22:6/20:5 | 1.30 ± 0.01 ^a | 1.26 ± 0.05 ^a | 1.28 ± 0.05 ^a | 1.25 ± 0.05 ^a | 1.50 ± 0.07 ^b | 1.48 ± 0.05 ^b | * | * | NS | |
| 20:4/20:5 | 0.21 ± 0.09 | 0.15 ± 0.01 | 0.15 ± 0.02 | 0.14 ± 0.02 | 0.17 ± 0.01 | 0.28 ± 0.21 | NS | * | NS | |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

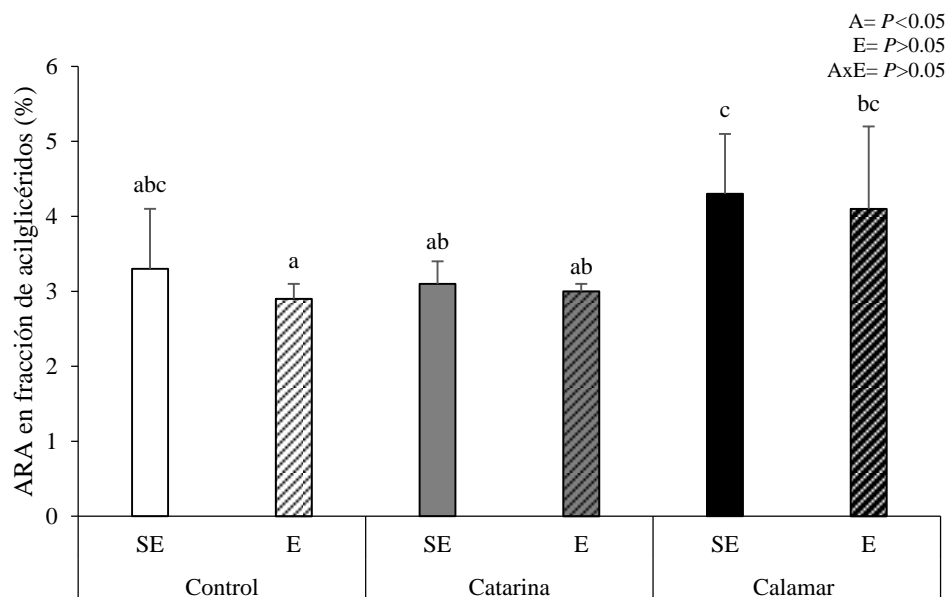


Figura 21. ARA (%) en fracción de acilglicéridos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea, medias \pm error estándar ($n = 3$). Letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

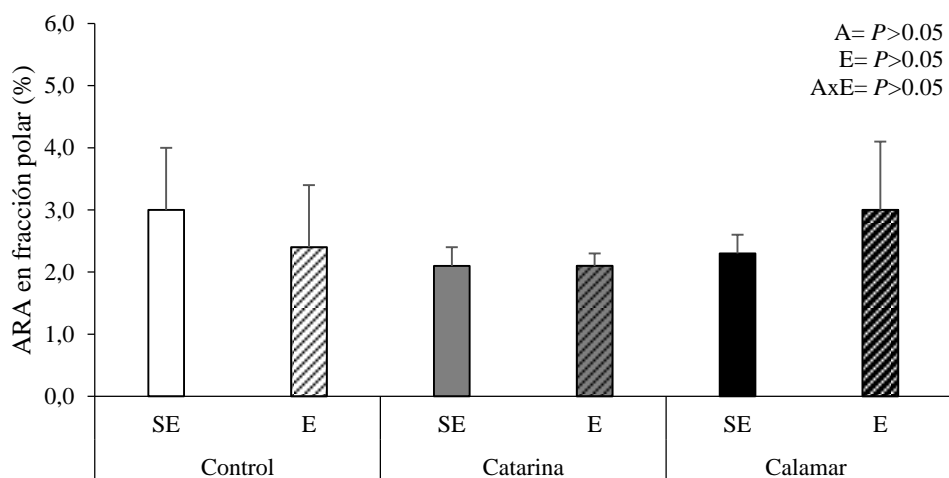


Figura 22. ARA (%) en la fracción de fosfolípidos del músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea, medias \pm error estándar ($n = 3$).

La mayoría de los ácidos grasos en hepatopáncreas se vieron significativamente afectados por el alimento, pero no por el estrés. Los camarones alimentados con el alimento con calamar tuvieron los niveles más bajos de SAT y MUFA, pero niveles más altos de PUFA y HUFA. Los camarones del tratamiento Calamar sin estrés tuvieron el valor más bajo de 18:0, (3.5%), seguido de los camarones de los tratamientos Control sin estrés y con estrés (3.7 y 3.9 %), los camarones del tratamiento Calamar con estrés (4.2%), los camarones del tratamiento Catarina con estrés (4.2%) y con el valor más alto En los camarones del tratamiento Catarina sin estrés (4.3%) (Tabla XVIII).

No se observó ningún efecto significativo del alimento sobre el estrés o los carotenoides en el músculo. No se encontraron diferencias significativas para la composición de esteroides en el músculo, ya sea por el efecto del alimento o el estrés (Tabla XIX).

Hubo un efecto significativo por el alimento en varios COP: los niveles de 7α -hidroxicolesterol fueron más bajos en los camarones no estresados alimentados con el alimento control, y los más altos en los camarones estresados alimentados con el alimento de Catarina. Los niveles de $5,6\beta$ -epoxicocolesterol estuvieron más bajos en los camarones estresados alimentados con calamar y no estresados, y más altos en los alimentados con Catarina y Control. Se detectó una interacción significativa para el $5,6\alpha$ -epoxicocolesterol por efecto de alimento y estrés; los camarones no estresados alimentados con Catarina tuvieron los valores más altos, mientras que los camarones no estresados alimentados con calamar tuvieron los valores más bajos. El colestanoetriol tuvo niveles más bajos en los camarones que no estaban estresados y que fueron alimentados con el alimento control, y los más altos independientemente del estrés en los camarones alimentados con Catarina. Los COP totales estuvieron más bajos en los camarones no estresados y alimentados con el alimento Control, seguidos por los camarones sin estrés alimentados con calamar, los camarones estresados alimentados con el alimento Control, luego los camarones estresados de los alimentos Catarina y calamar, y los más altos en los camarones sin estrés alimentados con el alimento Catarina (Figura 23). Se encontró un efecto significativo tanto del alimento como del estrés para el 7-cetocolesterol, con un nivel más bajo en los camarones sin estrés alimentados con el alimento Control, niveles intermedios en los

camarones sin estrés y estrés alimentados con el alimento con Catarina. Los niveles más altos se encontraron en los camarones sin estrés alimentados con el alimento con Catarina y los camarones estresados alimentados con Control (Tabla XX).

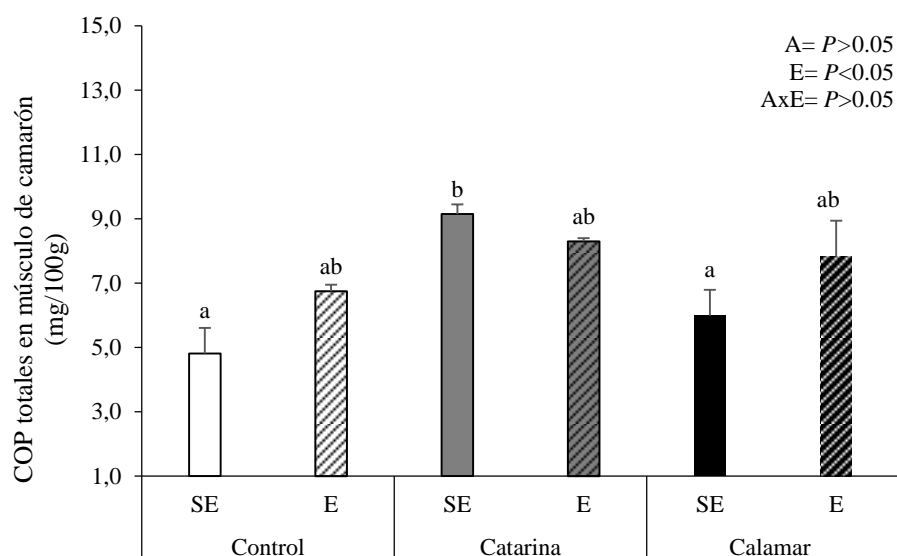


Figura 23. COP totales (mg/100g) en el músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea, medias \pm error estándar ($n = 3$). Letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Hubo un efecto significativo del alimento sobre las proteínas totales, los lípidos totales y los niveles de glucosa en hepatopáncreas (Tabla XXII). Las proteínas estuvieron más altas en los camarones alimentados con el alimento control y más bajas en los alimentos con calamar o Catarina. Los lípidos estuvieron más altos en los camarones alimentados con el alimento Catarina, con valores intermedios los camarones alimentados con el alimento Control y más bajos en los camarones alimentados con el alimento con calamar.

En cuanto a los esteroides en hepatopáncreas, solo se encontraron diferencias significativas en cuanto el stigmasterol, donde tanto los camarones estresados y sin estrés alimentados con Catarina y calamar tuvieron los valores más altos, mientras que los alimentados con Control, los más bajos (Tabla XXIII)

Tabla XVIII. Ácidos grasos totales (% del total de ácidos grasos) en hepatopáncreas de camarones de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | A | P | AxE |
|-----------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | | | |
| 14:0 | 0.8 ± 0.1 ^{ab} | 0.9 ± 0.1 ^{abc} | 1.1 ± 0.2 ^{ab} | 1.0 ± 0.1 ^c | 0.7 ± 0.2 ^a | 0.8 ± 0.2 ^a | * | NS | NS |
| 16:0 | 14.5 ± 0.1 ^{bc} | 14.9 ± 0.6 ^c | 14.7 ± 0.6 ^{bc} | 15.1 ± 0.0 ^c | 13.2 ± 0.6 ^a | 13.6 ± 1.2 ^{ab} | * | NS | NS |
| 18:0 | 4.4 ± 0.3 ^{ab} | 4.1 ± 0.3 ^{ab} | 4.7 ± 0.5 ^{ab} | 4.7 ± 0.1 ^c | 3.8 ± 0.1 ^a | 4.2 ± 0.6 ^{ab} | * | NS | NS |
| 16:1n-9 | 0.4 ± 0.0 ^{ab} | 0.4 ± 0.0 ^{ab} | 0.4 ± 0.0 ^{ab} | 0.5 ± 0.0 ^b | 0.4 ± 0.0 ^a | 0.4 ± 0.0 ^a | * | NS | NS |
| 16:1n-7 | 2.7 ± 0.1 ^{ab} | 2.7 ± 0.2 ^{ab} | 2.9 ± 0.2 ^b | 2.9 ± 0.2 ^b | 2.2 ± 0.4 ^a | 2.3 ± 0.1 ^a | * | NS | NS |
| 18:1n-9 | 21.4 ± 0.9 ^b | 21.5 ± 0.5 ^b | 19.2 ± 1.3 ^a | 19.4 ± 0.5 ^a | 19.3 ± 0.7 ^a | 19.6 ± 0.9 ^a | * | NS | NS |
| 18:1n-7 | 4.0 ± 1.3 ^c | 4.0 ± 0.2 ^c | 3.7 ± 0.3 ^{abc} | 3.9 ± 0.2 ^{bc} | 3.5 ± 0.1 ^a | 3.6 ± 0.1 ^{ab} | * | NS | NS |
| 18:2n-6 | 20.0 ± 1.0 | 20.5 ± 0.6 | 20.0 ± 1.2 | 19.9 ± 0.6 | 20.4 ± 0.5 | 20.4 ± 1.0 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.2 | 2.4 ± 0.2 | 2.2 ± 0.0 | 2.2 ± 0.2 | 2.0 ± 0.7 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 1.6 ± 0.2 ^{abc} | 1.3 ± 0.2 ^a | 1.5 ± 0.2 ^{ab} | 1.5 ± 0.0 ^{ab} | 1.9 ± 0.2 ^{bc} | 2.0 ± 0.2 ^c | * | NS | NS |
| 20:5n-3 | 8.2 ± 0.6 | 7.9 ± 0.7 | 8.0 ± 0.8 | 7.7 ± 0.2 | 8.6 ± 0.9 | 8.4 ± 1.2 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 4.7 ± 0.4 ^{ab} | 4.0 ± 0.5 ^a | 5.9 ± 0.7 ^{ab} | 5.9 ± 0.2 ^{ab} | 6.8 ± 0.8 ^b | 6.3 ± 1.5 ^b | * | NS | NS |
| Σ SAT | 20.8 ± 0.5 ^b | 21.0 ± 0.4 ^b | 21.8 ± 0.4 ^{bc} | 22.1 ± 0.1 ^c | 19.4 ± 0.6 ^a | 19.4 ± 1.7 ^a | * | NS | NS |
| Σ MUFA | 34.6 ± 0.3 ^{bc} | 34.8 ± 0.9 ^c | 32.4 ± 1.5 ^{ab} | 32.7 ± 0.0 ^{ab} | 31.9 ± 0.9 ^a | 32.4 ± 1.2 ^a | * | NS | NS |
| Σ PUFA | 41.6 ± 0.5 ^a | 41.1 ± 1.1 ^a | 42.9 ± 1.4 ^{ab} | 42.3 ± 0.2 ^a | 45.9 ± 1.1 ^b | 45.3 ± 2.5 ^b | * | NS | NS |
| Σ HUFA | 16.7 ± 0.6 ^{ab} | 15.3 ± 1.2 ^a | 17.3 ± 1.6 ^{ab} | 16.8 ± 0.4 ^{ab} | 19.5 ± 1.3 ^b | 19.1 ± 2.7 ^{ab} | * | NS | NS |
| Σ n-6 | 34.4 ± 0.8 | 34.9 ± 0.3 | 34.7 ± 1.5 | 34.7 ± 1.2 | 35.3 ± 0.9 | 35.4 ± 1.2 | NS | NS | NS |
| Σ n-3 | 16.2 ± 2.7 ^a | 15.8 ± 0.9 ^a | 18.1 ± 3.0 ^{ab} | 17.2 ± 1.6 ^{ab} | 19.4 ± 2.6 ^b | 18.9 ± 2.3 ^b | * | NS | NS |
| n-3/n-6 | 0.47 ± 0.08 ^{ab} | 0.45 ± 0.02 ^a | 0.52 ± 0.10 ^{ab} | 0.49 ± 0.05 ^{ab} | 0.55 ± 0.08 ^{bc} | 0.53 ± 0.08 ^b | * | NS | NS |
| 22:6/20:5 | 0.52 ± 0.19 ^{ab} | 0.47 ± 0.12 ^a | 0.68 ± 0.26 ^{ab} | 0.71 ± 0.22 ^{ab} | 0.74 ± 0.28 ^b | 0.67 ± 0.16 ^{ab} | * | NS | NS |
| 20:4/20:5 | 0.17 ± 0.01 ^{ab} | 0.14 ± 0.07 ^a | 0.17 ± 0.00 ^{ab} | 0.17 ± 0.01 ^{ab} | 0.20 ± 0.00 ^{bc} | 0.21 ± 0.02 ^c | * | NS | NS |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

Tabla XIX. Variables bioquímicas (mg/g) en músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | A | P | AxE |
|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | | | |
| Carbohidratos totales | 45.6 ± 5.1 ^{ab} | 44.1 ± 9.8 ^{ab} | 29.2 ± 5.6 ^a | 38.2 ± 1.3 ^{ab} | 55.8 ± 1.1 ^b | 50.8 ± 1.6 ^{ab} | * | * | NS |
| Proteínas totales | 752.3 ± 27.6 | 818.6 ± 38.4 | 761.0 ± 36.6 | 707.3 ± 30.2 | 769.1 ± 23.5 | 767.5 ± 23.4 | NS | NS | NS |
| Lípidos totales | 90.1 ± 1.6 ^a | 123.0 ± 23.1 ^{ab} | 187.8 ± 5.7 ^b | 197.9 ± 20.7 ^b | 195.7 ± 18.8 ^b | 152.6 ± 22.0 ^{ab} | * | NS | NS |
| Glucosa | 13.8 ± 1.3 | 13.1 ± 1.6 | 11.2 ± 1.6 | 11.5 ± 1.0 | 12.2 ± 1.9 | 13.9 ± 0.8 | NS | NS | NS |
| Astaxantina libre (%) | 72.7 ± 14.4 | 68.5 ± 19.4 | 76.3 ± 17.1 | 54.9 ± 22.5 | 68.5 ± 11.0 | 75.2 ± 13.5 | NS | NS | NS |
| Astaxantina esterificada(%) | 21.1 ± 10.6 | 18.8 ± 12.1 | 23.6 ± 17.1 | 33.3 ± 17.3 | 19.4 ± 3.8 | 19.9 ± 10.0 | NS | NS | NS |
| Alfa caroteno (%) | 1.9 ± 1.9 | 6.2 ± 3.1 | ND | 5.9 ± 3.7 | 1.9 ± 1.9 | 4.7 ± 4.8 | NS | NS | NS |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$). NS=No significativa ($P>0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P<0.05$).

Tabla XX. Esteroles en músculo (mg/g) de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | A | P | AxE |
|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | | | |
| Dihidrocolesterol | 0.49 ± 0.2 | 0.44 ± 0.11 | 0.34 ± 0.01 | 0.37 ± 0.08 | 0.21 ± 0.07 | 0.23 ± 0.04 | NS | NS | NS |
| Colesterol | 19.9 ± 1.32 | 19.5 ± 1.29 | 20.6 ± 1.0 | 23.0 ± 0.72 | 22.5 ± 0.53 | 22.1 ± 2.15 | NS | NS | NS |
| Brasicasterol | 0.41 ± 0.12 | 0.47 ± 0.09 | 0.27 ± 0.09 | 0.14 ± 0.08 | 0.50 ± 0.06 | 0.35 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| Campesterol | 0.12 ± 0.02 | 0.17 ± 0.10 | 0.18 ± 0.03 | 0.15 ± 0.00 | 0.05 ± 0.02 | 0.08 ± 0.04 | NS | NS | NS |
| Estigmasterol | 0.13 ± 0.05 | 0.42 ± 0.34 | 0.03 ± 0.00 | 0.06 ± 0.01 | 0.04 ± 0.00 | 0.02 ± 0.02 | NS | NS | NS |
| β-sitosterol | 0.42 ± 0.04 | 0.28 ± 0.06 | 0.32 ± 0.03 | 0.37 ± 0.14 | 0.34 ± 0.06 | 0.27 ± 0.04 | NS | NS | NS |
| Esteroles totales | 1.6 ± 0.1 ^{ab} | 1.9 ± 0.4 ^b | 1.1 ± 0.1 ^a | 1.0 ± 0.3 ^a | 1.1 ± 0.2 ^a | 0.9 ± 0.1 ^a | * | NS | NS |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$). NS=No significativa ($P>0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P<0.05$).

Tabla XXI. COP en músculo (mg/100g) de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | A | P | AxE |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | | | |
| 7a-Hidroxicolesterol | 1.21 ± 0.08 ^a | 1.54 ± 0.10 ^{ab} | 1.84 ± 0.14 ^{ab} | 1.89 ± 0.21 ^b | 1.50 ± 0.04 ^{ab} | 1.67 ± 0.16 ^{ab} | * | NS | NS |
| 7b-Hidroxicolesterol | 0.30 ± 0.02 | 0.51 ± 0.03 | 1.64 ± 0.13 | 1.33 ± 0.15 | 1.04 ± 0.02 | 2.18 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| 5,6b-Epoxicolesterol | 0.94 ± 0.06 ^{ab} | 1.23 ± 0.08 ^b | 1.15 ± 0.09 ^b | 1.17 ± 0.13 ^b | 0.63 ± 0.01 ^a | 0.69 ± 0.07 ^a | * | NS | NS |
| 5,6a-Epoxicolesterol | 0.65 ± 0.04 ^{ab} | 0.75 ± 0.05 ^{ab} | 1.33 ± 0.10 ^b | 0.97 ± 0.11 ^{ab} | 0.30 ± 0.01 ^a | 0.72 ± 0.07 ^{ab} | * | NS | * |
| Colestanotriol | 0.77 ± 0.05 ^a | 0.91 ± 0.06 ^{ab} | 1.34 ± 0.10 ^b | 1.28 ± 0.14 ^b | 1.12 ± 0.03 ^{ab} | 1.19 ± 0.12 ^{ab} | * | NS | NS |
| 25-Hidroxicolesterol | 0.61 ± 0.10 | 0.84 ± 0.06 | 0.90 ± 0.07 | 0.81 ± 0.09 | 0.70 ± 0.12 | 0.68 ± 0.07 | NS | NS | NS |
| 7-cetocolesterol | 0.33 ± 0.12 | 0.98 ± 0.16 | 0.95 ± 0.07 | 0.86 ± 0.10 | 0.71 ± 0.12 | 0.70 ± 0.07 | NS | NS | NS |
| COP Totales | 4.81 ± 0.62 ^a | 6.75 ± 0.95 ^{ab} | 9.15 ± 0.92 ^b | 8.30 ± 0.97 ^{ab} | 5.99 ± 0.34 ^a | 7.84 ± 0.96 ^{ab} | * | NS | * |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

Tabla XXII. Variables bioquímicas (mg/g) y carotenoides (mg/100g) en hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | A | P | AxE |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | | | |
| Carbohidratos totales | 41.1 ± 1.9 ^{bc} | 37.3 ± 4.6 ^{bc} | 48.7 ± 6.0 ^a | 45.4 ± 3.8 ^{ab} | 33.2 ± 0.6 ^c | 43.6 ± 0.6 ^{ab} | * | NS | * |
| Proteínas totales | 571.0 ± 21.3 ^a | 437.9 ± 26.9 ^{ab} | 332.4 ± 1.8 ^b | 335.8 ± 29.2 ^b | 278.3 ± 4.2 ^b | 366.9 ± 9.5 ^b | * | NS | NS |
| Lípidos totales | 452.0 ± 54.8 ^{ab} | 621.5 ± 47.0 ^{ab} | 694.2 ± 49.8 ^b | 680.5 ± 45.7 ^b | 418.3 ± 52.9 ^a | 402.2 ± 24.7 ^a | * | NS | NS |
| Glucosa | 12.0 ± 3.5 ^{ab} | 7.4 ± 1.2 ^a | 13.9 ± 1.0 ^{ab} | 20.7 ± 1.5 ^b | 16.5 ± 1.1 ^{ab} | 13.5 ± 2.0 ^{ab} | * | * | * |
| Lactato | 1.13 ± 0.18 ^{ab} | 2.38 ± 0.21 ^a | 2.16 ± 0.16 ^{ab} | 2.13 ± 0.40 ^{ab} | 0.99 ± 0.03 ^c | 2.09 ± 0.32 ^{bc} | NS | * | * |
| Carotenoides totales | 5.1 ± 0.9 | 4.1 ± 0.8 | 19.5 ± 13.2 | 15.9 ± 9.1 | 10.7 ± 5.6 | 9.8 ± 3.0 | NS | NS | NS |
| Astaxantina libre (%) | 85.2 ± 5.4 | 88.6 ± 2.6 | 86.6 ± 0.4 | 87.2 ± 1.9 | 88.2 ± 0.0 | 82.0 ± 4.0 | NS | NS | NS |
| Astaxantina esterificada (%) | 8.2 ± 2.1 | 6.2 ± 0.3 | 6.6 ± 0.1 | 6.7 ± 0.7 | 6.6 ± 0.2 | 11.4 ± 3.3 | NS | NS | NS |
| Alfa caroteno (%) | 6.5 ± 3.3 | 5.2 ± 2.4 | 6.8 ± 0.5 | 6.1 ± 1.3 | 5.1 ± 0.2 | 6.6 ± 0.8 | NS | NS | NS |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

Tabla XXIII. Esteroles (mg/g) en hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Control | | Catarina | | Calamar | | A | P | AxE |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | SE | E | | | |
| Dihidrocolesterol | 5.45 ± 0.73 | 5.15 ± 1.23 | 6.81 ± 1.51 | 4.46 ± 0.40 | 5.20 ± 0.51 | 7.76 ± 1.54 | NS | NS | NS |
| Colesterol | 15.0 ± 1.97 | 17.1 ± 2.58 | 17.3 ± 4.61 | 14.6 ± 0.37 | 19.3 ± 1.14 | 29.6 ± 4.43 | NS | NS | NS |
| Campesterol | 1.03 ± 0.34 | 1.80 ± 0.75 | 1.23 ± 0.25 | 1.55 ± 0.29 | 1.38 ± 0.32 | 2.04 ± 0.59 | NS | NS | NS |
| Stigmasterol | 0.90 ± 0.13 ^{ab} | 1.28 ± 0.18 ^a | 0.50 ± 0.07 ^b | 0.51 ± 0.11 ^b | 0.66 ± 0.09 ^b | 0.73 ± 0.30 ^b | * | NS | NS |
| β-sitosterol | 1.32 ± 0.30 | 1.41 ± 0.37 | 1.31 ± 0.28 | 1.34 ± 0.17 | 2.06 ± 0.13 | 2.62 ± 0.88 | NS | NS | NS |
| Esteroles totales | 8.7 ± 1.4 | 9.6 ± 0.9 | 9.8 ± 2.2 | 7.8 ± 1.5 | 9.2 ± 0.4 | 13.1 ± 0.9 | NS | NS | NS |

A=Alimento, E=Estrés, AxE=interacción, Medias ± error estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). NS=No significativa ($P > 0.05$). * Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$).

Los niveles de PGEM fueron más bajos en los camarones sin estrés alimentados con los alimentos Control y calamar, y los más altos en los camarones estresados de los mismos alimentos. Los valores de PGEM en los otros tratamientos tuvieron valores similares e intermedios en comparación con el Control (Figura 24).

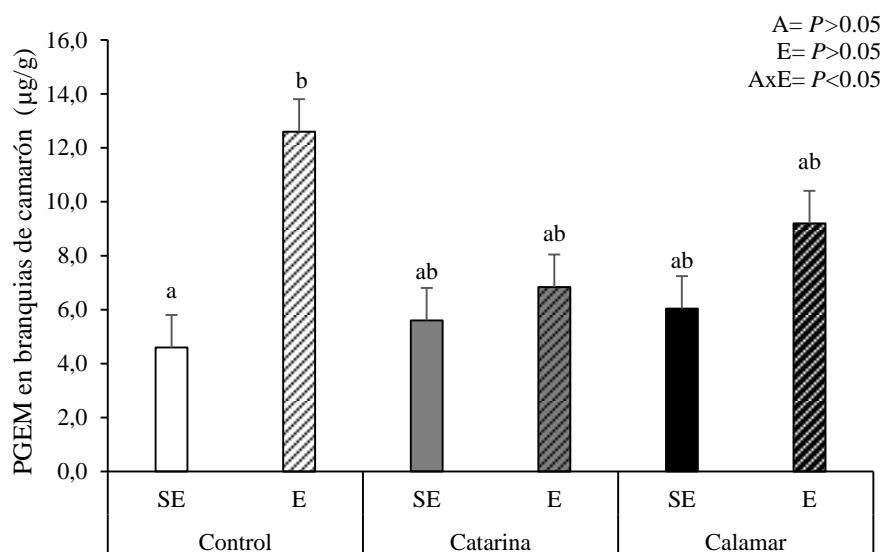


Figura 24. PGEM ($\mu\text{g/g}$) en branquias de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea, medias \pm error estándar ($n = 3$). Letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

Los hidroperóxidos fueron más bajos en los camarones sin estrés del Control y del de calamar; los valores más altos se observaron en los camarones estresados del alimento Control, con valores intermedios para el resto de los tratamientos (Figura 25). El 8-isoprostano, no hubo diferencias significativas, pero si se observó una tendencia a estar más altos en los camarones alimentados con el alimento Control, independientemente del estrés, y más bajo en los camarones sin estrés alimentados con calamar, con valores intermedios para los demás tratamientos (Figura 26).

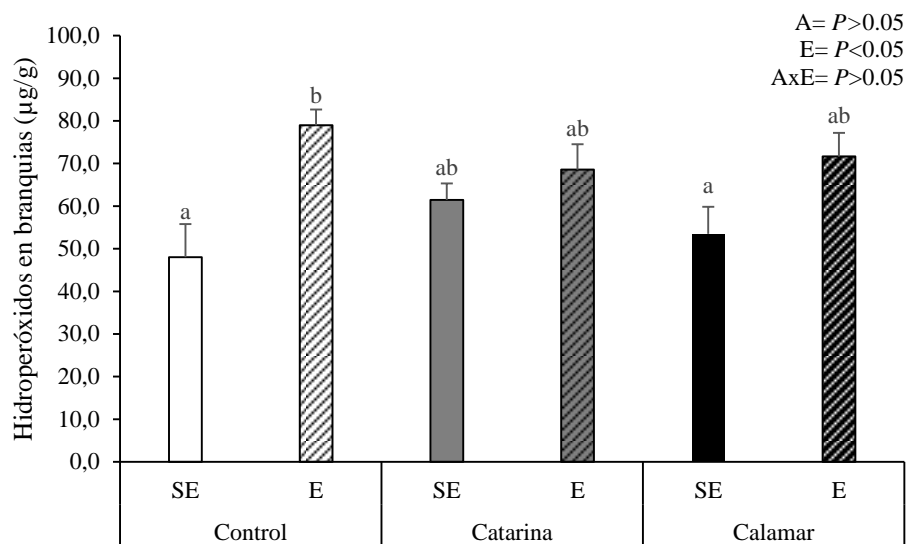


Figura 25. Hidroperóxidos ($\mu\text{g/g}$) en branquias de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea, medias \pm error estándar ($n = 3$). Letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

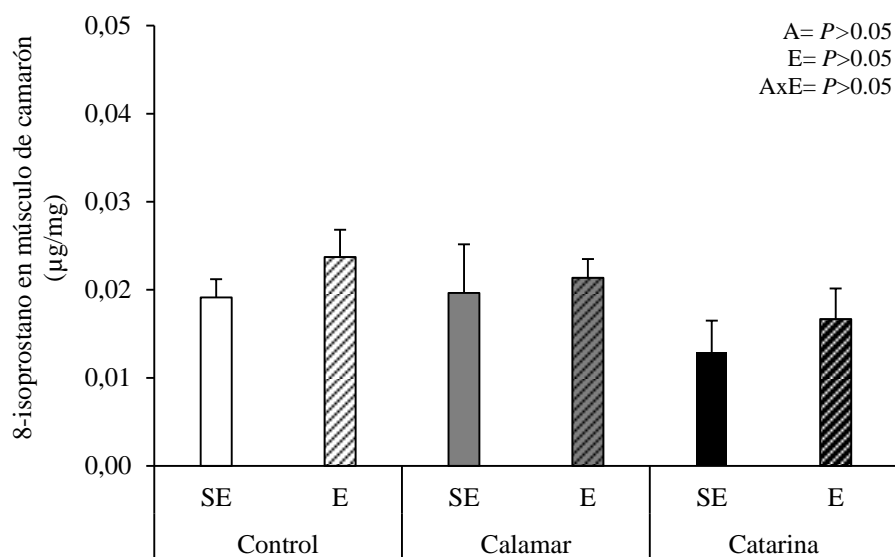


Figura 26. Concentración de 8-isoprostanos ($\mu\text{g/mg}$) en músculo de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea, medias \pm error estándar ($n = 3$).

La expresión génica relativa de los transcritos que codifican las enzimas antioxidantes en hepatopáncreas de camarón fue mayor en *GPx* (cambio 2.4 veces) en los camarones estresados alimentados con Catarina, que su control y *CATALASA* en los camarones estresados del Control (cambio de 1.1 veces) que su control, y en los camarones estresados alimentados con Catarina (cambio de 2.6 veces), mientras tanto, en los otros tratamientos estos genes estaban subexpresados (valor menor que 1). La expresión genética relativa de *COX* y *SOD* no fue diferente entre los tratamientos (Figura 27).

Se realizó un análisis de PCA considerando las siguientes variables: supervivencia durante el bioensayo de crecimiento, alimento consumido, ganancia de peso, mudas, supervivencia durante el estrés, coloración blanca, variables bioquímicas en músculo y hepatopáncreas, 8-isoprostano, PGEM en branquias, ácidos grasos en la fracción neutra y polar de músculo, oxiesteroles, LOOH en branquias, variables bioquímicas en músculo y hepatopáncreas, expresión de genes de enzimas *GPx*, *Catalasa*, *SOD* y *COX*, ácidos grasos en músculo y hepatopáncreas, pigmentos en músculo y camarones enteros, esteroles en músculo y hepatopáncreas y oxiesteroles. Cinco factores tuvieron valores ≥ 1.0 y juntos representaron el 100% de la variación total.

Las variables que fueron ≥ 0.7 y positivas en el primer factor fueron proteínas en hepatopáncreas, glucosa en hepatopáncreas, 7a-hidroxicolesterol, 5,6a-hidroxicolesterol, colestanoetriol y 25-hidrocolesterol, mientras que aquellas que se asociaron negativamente fueron la supervivencia durante el bioensayo de crecimiento, el alimento consumido la ganancia de peso, las mudas, el lactato en el músculo y el lactato en el hepatopáncreas, el 8-isoprostano en el músculo, la expresión del gen *SOD*, 22:6n-3 en la fracción neutra, astaxantina esterificada en camarones enteros, alfa caroteno en camarones enteros, colesterol en hepatopáncreas, b-sitosterol en hepatopáncreas, 7b-hidroxicolesterol, y juntos representaron el 37.4% de la variación.

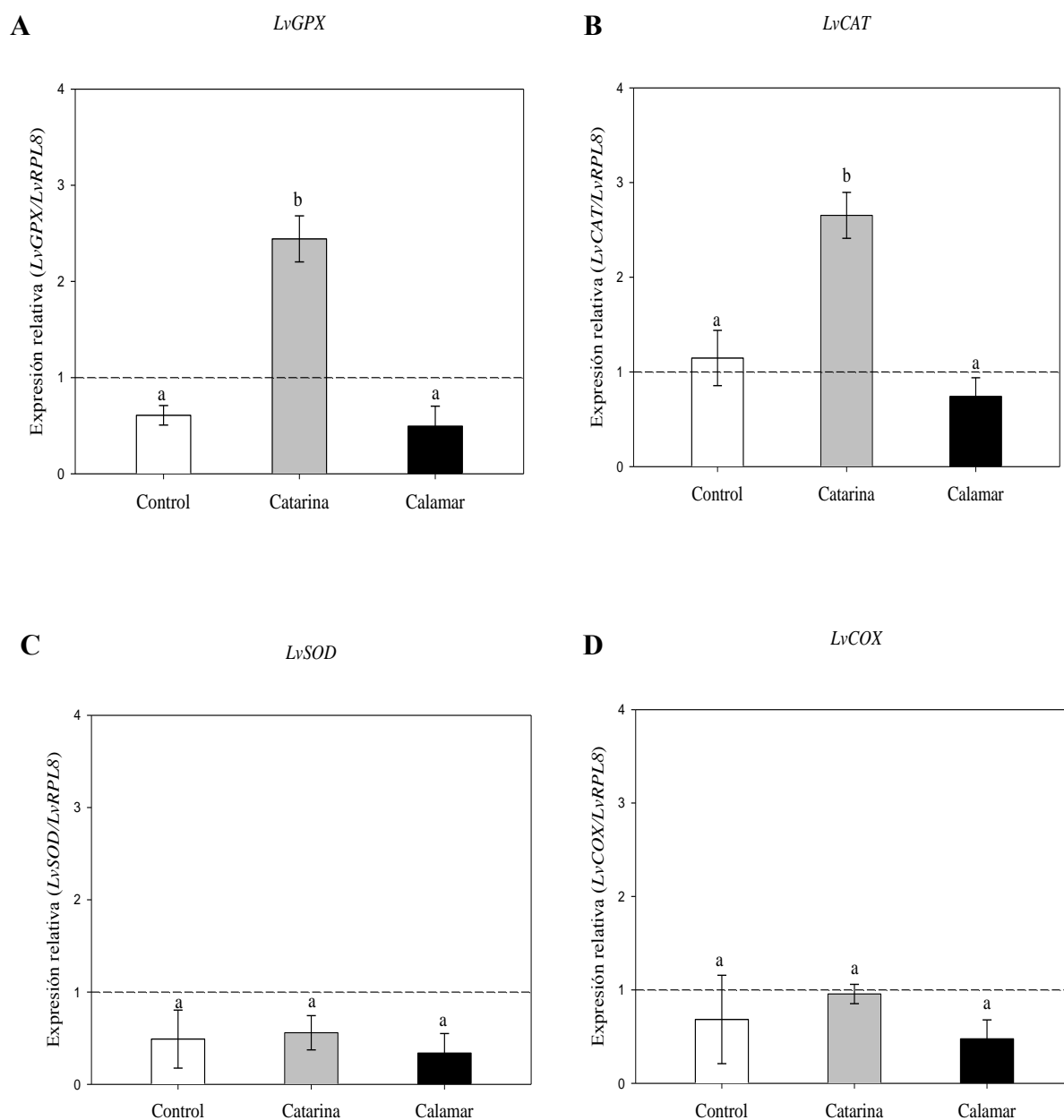


Figura 27. Expresión de ARNm de hepatopáncreas de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea, medias \pm error estándar ($n = 3$). Letra sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). A) Glutación peroxidasa B) Catalasa C) Superóxido dismutasa D) Ciclooxigenasa. El eje Y muestra la expresión relativa de ARNm (gen objetivo / LvRPL8); el eje X muestra grupos estresados de alimentos alternativos y grupos no estresados (valor = 1).

Tabla XXIV. Factores estimados por PCA de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea.

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 |
|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| % Supervivencia - crecimiento | -0.95 | 0.02 | -0.15 | 0.28 | 0.05 |
| Alimento - crecimiento | -0.83 | -0.47 | -0.03 | 0.28 | 0.04 |
| Tasa de crecimiento | -0.92 | -0.25 | -0.09 | 0.29 | 0.05 |
| Mudas - crecimiento | -0.89 | 0.31 | -0.21 | 0.24 | 0.04 |
| % Supervivencia durante el estrés | -0.54 | 0.16 | -0.76 | -0.27 | -0.16 |
| Sin respuesta durante el estrés | 0.10 | -0.03 | 0.92 | 0.19 | -0.33 |
| % coloración blanca durante el estrés | -0.14 | 0.17 | 0.73 | 0.16 | -0.63 |
| CHO-M | -0.08 | -0.70 | -0.13 | 0.70 | -0.01 |
| Proteínas-M | -0.39 | -0.56 | 0.70 | 0.00 | 0.22 |
| Lípidos-M | -0.47 | 0.19 | -0.74 | -0.43 | 0.05 |
| Lactato-M | -0.86 | -0.18 | -0.04 | 0.35 | -0.34 |
| Glucosa-M | 0.57 | -0.80 | -0.06 | -0.11 | -0.11 |
| CHO-HP | -0.45 | 0.41 | -0.20 | -0.74 | -0.19 |
| Proteínas-HP | 0.76 | -0.60 | 0.17 | -0.17 | -0.05 |
| Lípidos-HP | 0.48 | 0.82 | 0.25 | 0.09 | 0.18 |
| Lactato-HP | -0.70 | 0.42 | -0.33 | 0.47 | -0.06 |
| Glucosa-HP | 0.70 | -0.53 | -0.15 | -0.44 | -0.15 |
| LOOH branquias | -0.21 | 0.52 | 0.73 | -0.31 | -0.25 |
| 8-isoprostano | -0.71 | 0.02 | 0.37 | -0.60 | -0.10 |
| PGEM branquias | 0.09 | -0.14 | 0.95 | 0.27 | -0.06 |
| GPx | 0.16 | 0.65 | -0.37 | 0.30 | -0.58 |
| SOD | -0.78 | -0.36 | -0.11 | -0.49 | 0.07 |
| CATALASA | 0.25 | 0.64 | -0.16 | 0.37 | -0.61 |
| COX | 0.41 | 0.28 | -0.82 | 0.14 | 0.24 |
| 20:4n-6 LN-Músculo | -0.53 | -0.72 | -0.44 | 0.08 | 0.11 |
| 22:6n-3 LN-Músculo | -0.73 | 0.02 | 0.28 | 0.58 | 0.22 |
| 20:4n-6 LP-Músculo | 0.08 | -0.74 | -0.04 | -0.67 | -0.02 |
| 22:6n-3 LP-Músculo | -0.56 | -0.54 | 0.36 | -0.39 | -0.32 |
| 20:4n-6 HP | -0.46 | -0.86 | 0.00 | 0.23 | -0.07 |
| 20:5n-3 HP | 0.46 | -0.82 | -0.15 | 0.30 | -0.02 |
| 22:6n-3 HP | -0.32 | -0.79 | -0.11 | 0.46 | 0.23 |
| Astaxantina libre camarón entero | 0.90 | 0.03 | -0.24 | 0.34 | 0.07 |
| Astaxantina esterificada camarón | -0.81 | -0.26 | 0.35 | -0.31 | -0.22 |
| Alfa caroteno camarón completo | -0.83 | 0.40 | -0.01 | -0.31 | 0.22 |
| Dihidrocolesterol M | 0.92 | 0.02 | 0.05 | -0.35 | -0.18 |
| Colesterol M | -0.67 | 0.28 | -0.32 | 0.45 | -0.41 |
| Estigmasterol M | 0.71 | -0.24 | 0.63 | 0.20 | 0.07 |
| β -sitosterol M | 0.46 | -0.03 | -0.83 | -0.13 | -0.29 |
| Dihidrocolesterol HP | -0.67 | -0.08 | 0.28 | -0.63 | 0.27 |
| Colesterol HP | -0.84 | -0.32 | 0.40 | -0.18 | -0.04 |
| Estigmasterol HP | 0.55 | -0.59 | 0.59 | 0.05 | 0.03 |
| β -sitosterol HP | -0.87 | -0.44 | 0.20 | 0.08 | -0.10 |
| 7 α -Hidroxicolesterol | -0.38 | 0.88 | 0.23 | 0.14 | -0.03 |
| 7 β -Hidroxicolesterol | -0.88 | 0.40 | 0.18 | -0.17 | -0.03 |
| 5,6 α -Epoxicolesterol | 0.11 | 0.83 | 0.17 | -0.50 | 0.14 |
| 5,6 β -Epoxicolesterol | 0.71 | 0.63 | 0.32 | -0.10 | -0.01 |
| Colestanotriol | -0.66 | 0.71 | 0.00 | 0.07 | 0.22 |
| 25-Hidroxicolesterol | 0.17 | 0.80 | 0.39 | 0.16 | 0.39 |
| 7-cetocolesterol | -0.05 | 0.65 | 0.57 | 0.38 | 0.31 |

En el segundo factor, los lípidos en hepatopáncreas, 7 α -hidroxicolesterol, 5,6 β -hidroxicolesterol, colestanoetriol y 25-hidroxicolesterol se asociaron positivamente, mientras que los que se asociaron negativamente fueron carbohidratos en el músculo, glucosa en el músculo, 20:4n-6 en la fracción neutra y polar, 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3 en hepatopáncreas, y juntos representaron el 26.4% de la variación.

En el tercer factor, coloración blanca post-estrés, las proteínas en el músculo, el LOOH en las branquias y el PGEM en las branquias se asociaron positivamente, mientras que las que se asociaron negativamente fueron la supervivencia durante el estrés, los lípidos en el músculo, la expresión del gen COX, el β -sitosterol en músculo y juntos representaron el 18.2% de la variación.

En el cuarto factor, los carbohidratos en el músculo se asociaron positivamente, mientras que los que se asociaron negativamente fueron los carbohidratos en hepatopáncreas, y juntos representaron el 12.6% de la variación.

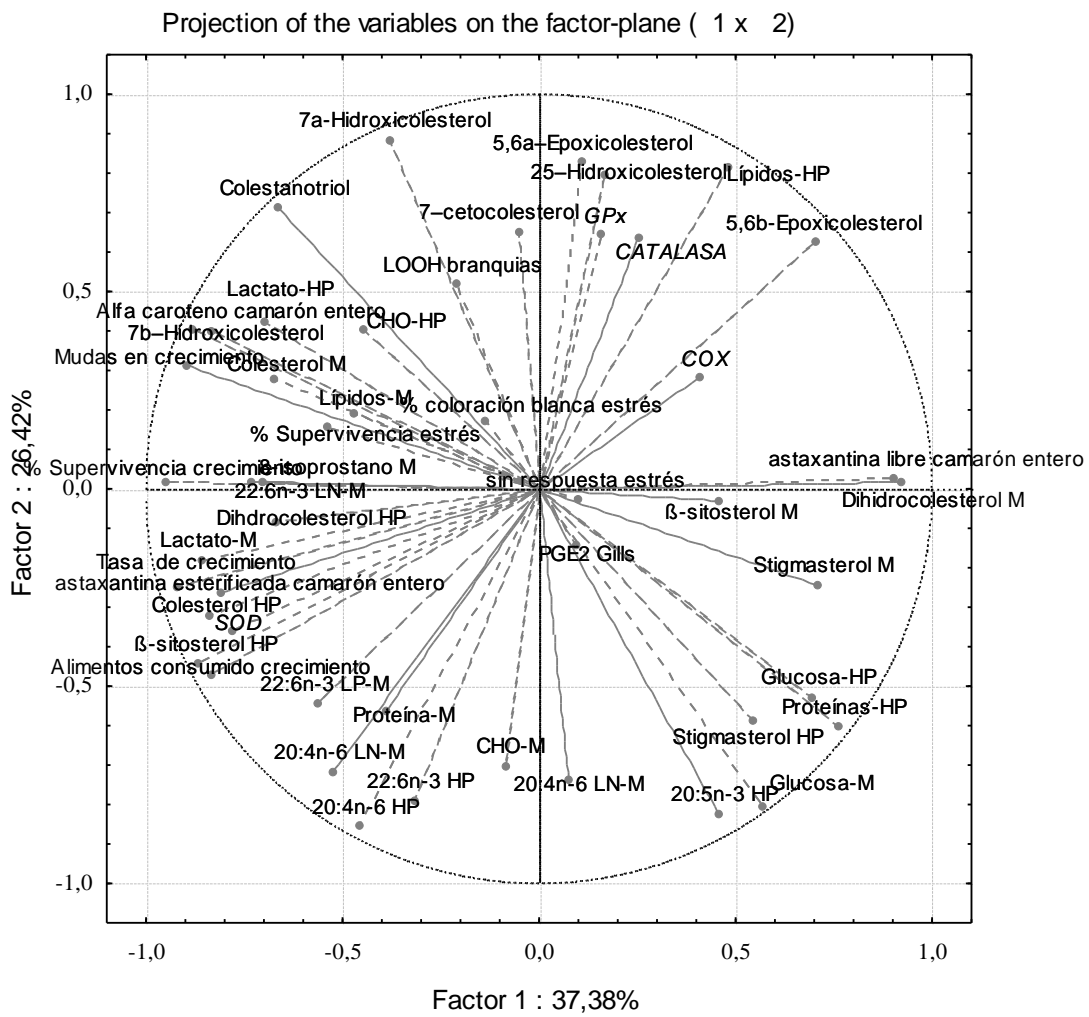
En el quinto factor, ninguna variable de las analizadas se asoció significativamente y representó el 5.5% de la variación (Tabla XXIV).

La Figura 28A) representa el PCA para los primeros dos factores que explican el 63.8% de la variación total. La figura 28B) representa el PCA para el primer y tercer factores que explican el 55.5% de la variación total.

Tabla XXV. Eigenvalores estimados por PCA de camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a un estrés por manipulación y exposición aérea

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 |
|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Eigenvalor | 18.32 | 12.95 | 8.90 | 6.17 | 2.67 |
| Varianza total (%) | 37.38 | 26.42 | 18.16 | 12.59 | 5.45 |
| Eigenvalor acumulado | 18.32 | 31.26 | 40.16 | 46.33 | 49.00 |
| Acumulado (%) | 37.38 | 63.80 | 81.96 | 94.55 | 100.00 |

A)



B)

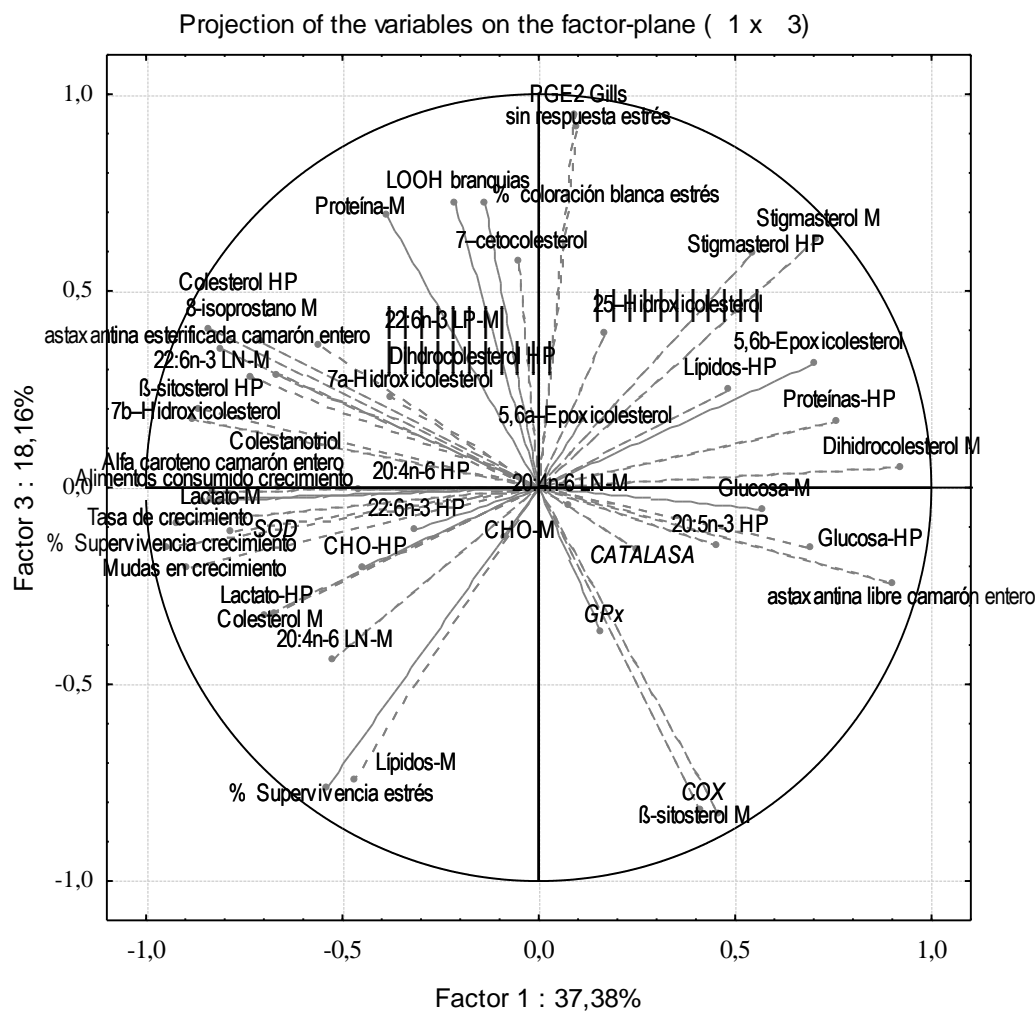


Figura 28. A) Análisis de componentes principales, que muestra los factores 1 y 2. B) Análisis de componentes principales que muestra los factores 1 y 3 de variables seleccionadas en camarones alimentados con los alimentos experimentales y sometidos a estrés por manipulación y exposición aerea.

7.2. Determinación de la dosis, el tiempo y la administración más adecuada de un inhibidor de ciclooxigenasas suministrado en el alimento y evaluar su efecto sobre la producción de prostaglandinas en camarones.

7.2.1 Determinación de PGEM en un intervalo tiempo/día

En cuanto la concentración de prostaglandinas en las branquias de camarón, se observaron diferencias significativas por efecto de la dosis y el tiempo de suministro de ASA, donde los organismos de los tratamientos con menor concentración de PGEM fueron a las 0 horas, con un fuerte incremento del grupo control y ASA 50 a 1 h, sin variación importante para los camarones en ayuno (Figuras 29 y 30).

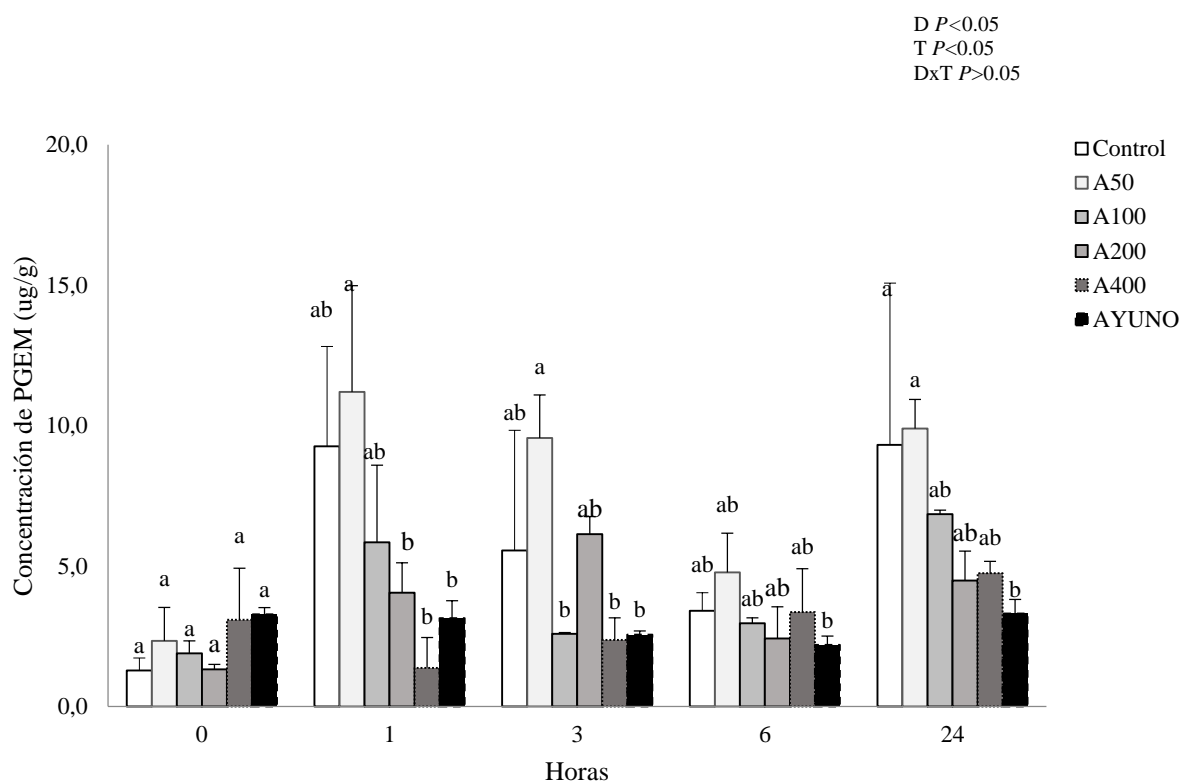


Figura 29. Concentración de PGEM ($\mu\text{g/g}$ en peso húmedo) en branquias de camarón del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA, medias \pm error estándar. ANOVA bifactorial, Dosis= D, Tiempo= T, interacción= D \times T. Los post-hocs se realizaron por separado para cada tiempo.

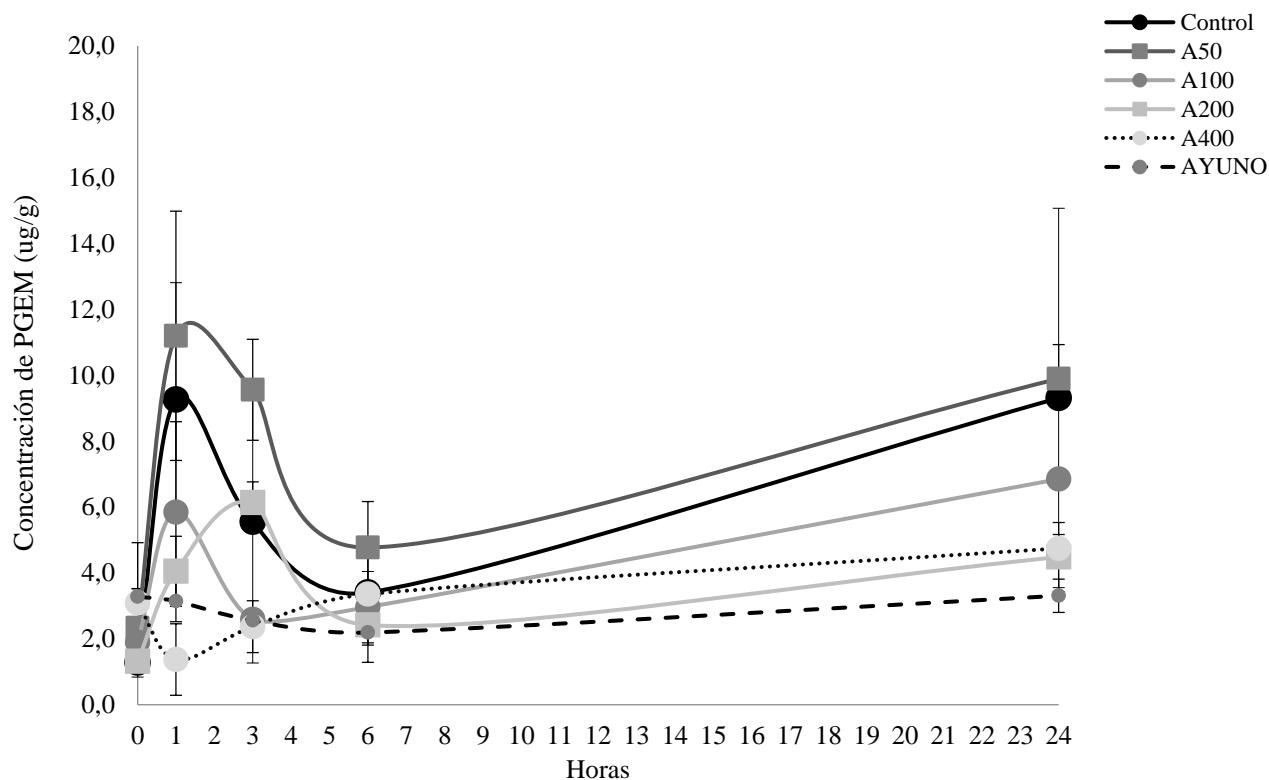


Figura 30. Concentración de PGEM ($\mu\text{g/g}$ en peso húmedo) a lo largo del tiempo en branquias de camarón del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA, medias \pm error estándar.

7.2.2 Daño apoptótico en tejidos, área total y atrofia branquial

Los tejidos con mayor apoptosis fueron el músculo, el tejido conjuntivo, así como la base branquial, donde no hay una dosis específica que haya afectado a todos los tejidos (Figura 31). En la figura 32, se observa la atrofia total branquial y en la figura 34 en daño histológico en la branquia donde se observaron laminaciones y fusionamientos de branquias en tratamientos ASA 50, 100, 200 y 400 en en tiempo 0. En la figura 33, se observan algunos tejidos que fueron sometidos a la técnica de TUNEL, en las branquias tratadas con ASA se encontraron hemocitos apoptóticos, el músculo con fibroblastos apoptóticos, núcleos de fibra muscular y en hepatopáncreas, túbulos apoptóticos.

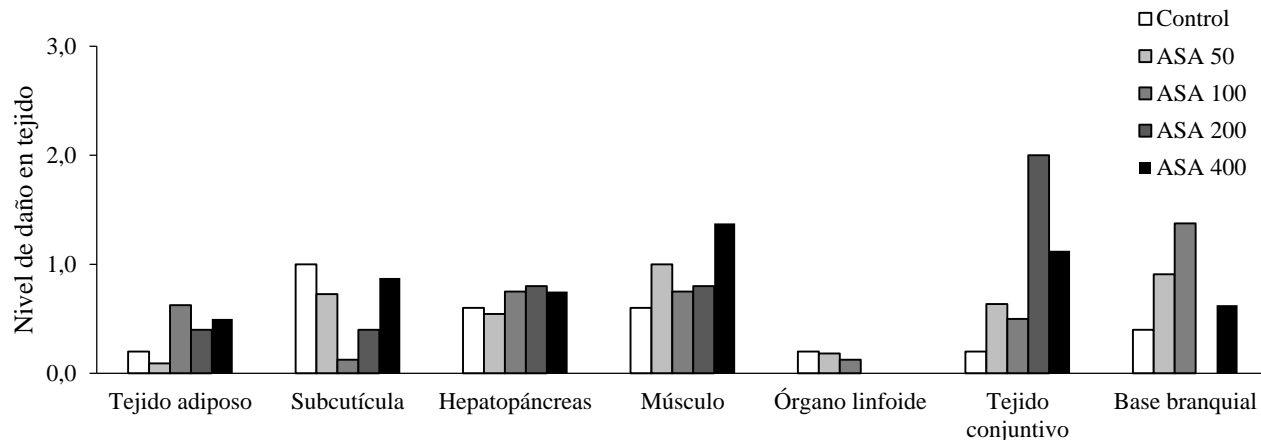


Figura 31. Nivel de daño apoptótico en tejidos de camarón del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA, se muestra daño de tejido por tratamiento, donde nivel de daño, 0: sin daño, 1: bajo, 2: medio y 3: alto.

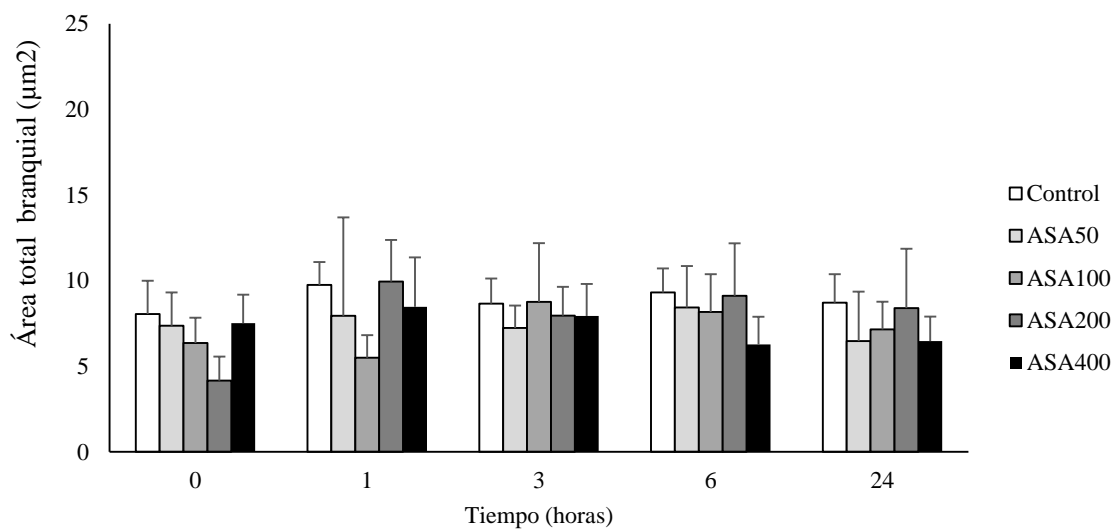


Figura 32. Atrofia branquial (medida en área total branquial) en camarones del bioensayo dosis y tiempo de suministro de ASA, medias \pm error estándar, a los tiempos 0, 1, 3, 6 y 24 horas por tratamiento.

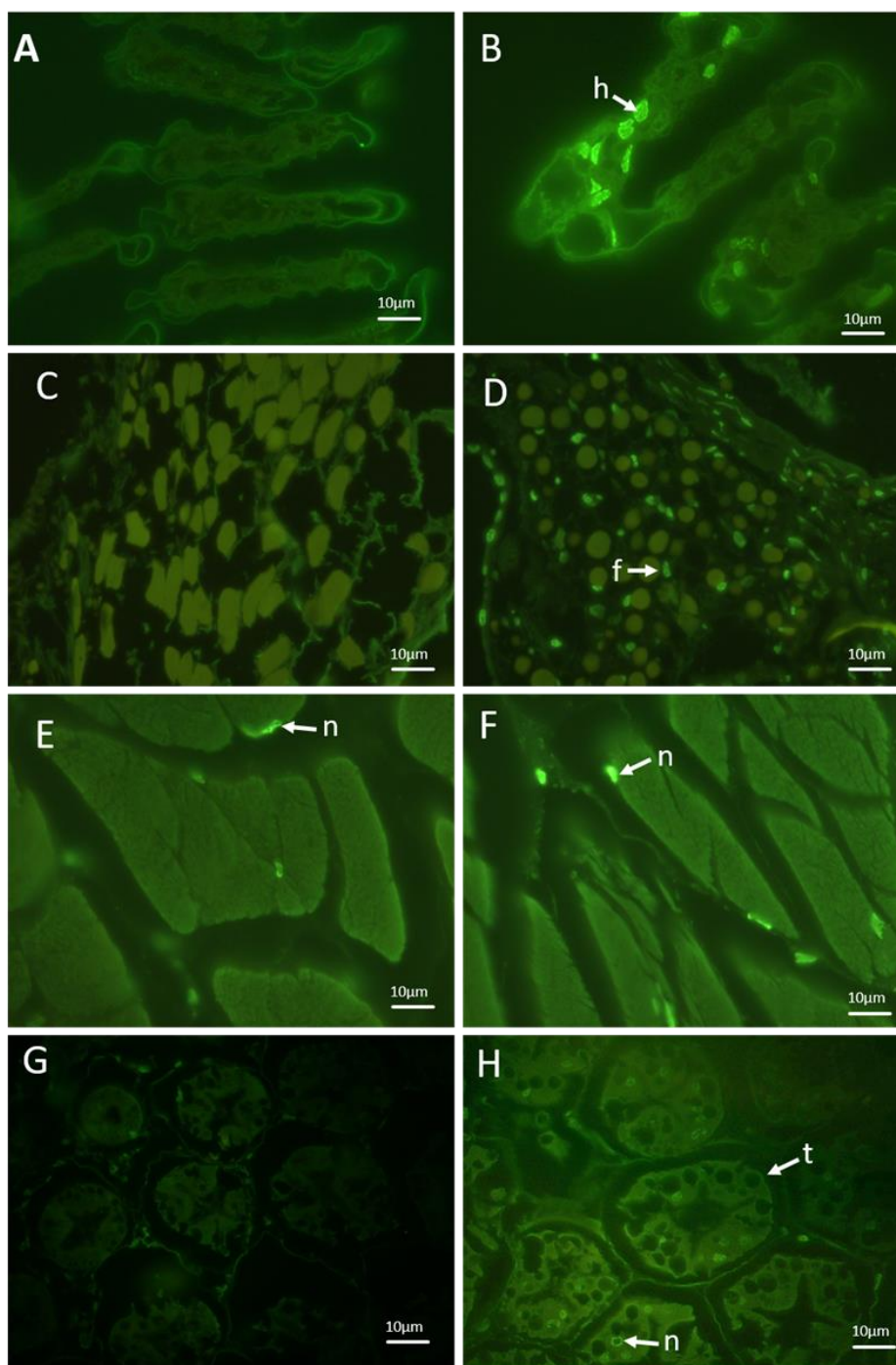


Figura 33. Tejidos de camarón positivos a técnica TUNEL. A) Branquias de camarón de tratamiento control; B) Branquias tratadas con ASA; C) Tejido conjuntivo control (60×); D) Tejido conjuntivo tratado con dosis ASA; E) Músculo control; F) Músculo control tratado con dosis ASA; G) Hepatopáncreas control; H) Hepatopáncreas tratado con dosis ASA; h, hemocitos; f, fibroblasto; n, núcleo de fibra muscular; n, núcleo; t, túbulo de hepatopáncreas. Técnica TUNEL (60×).

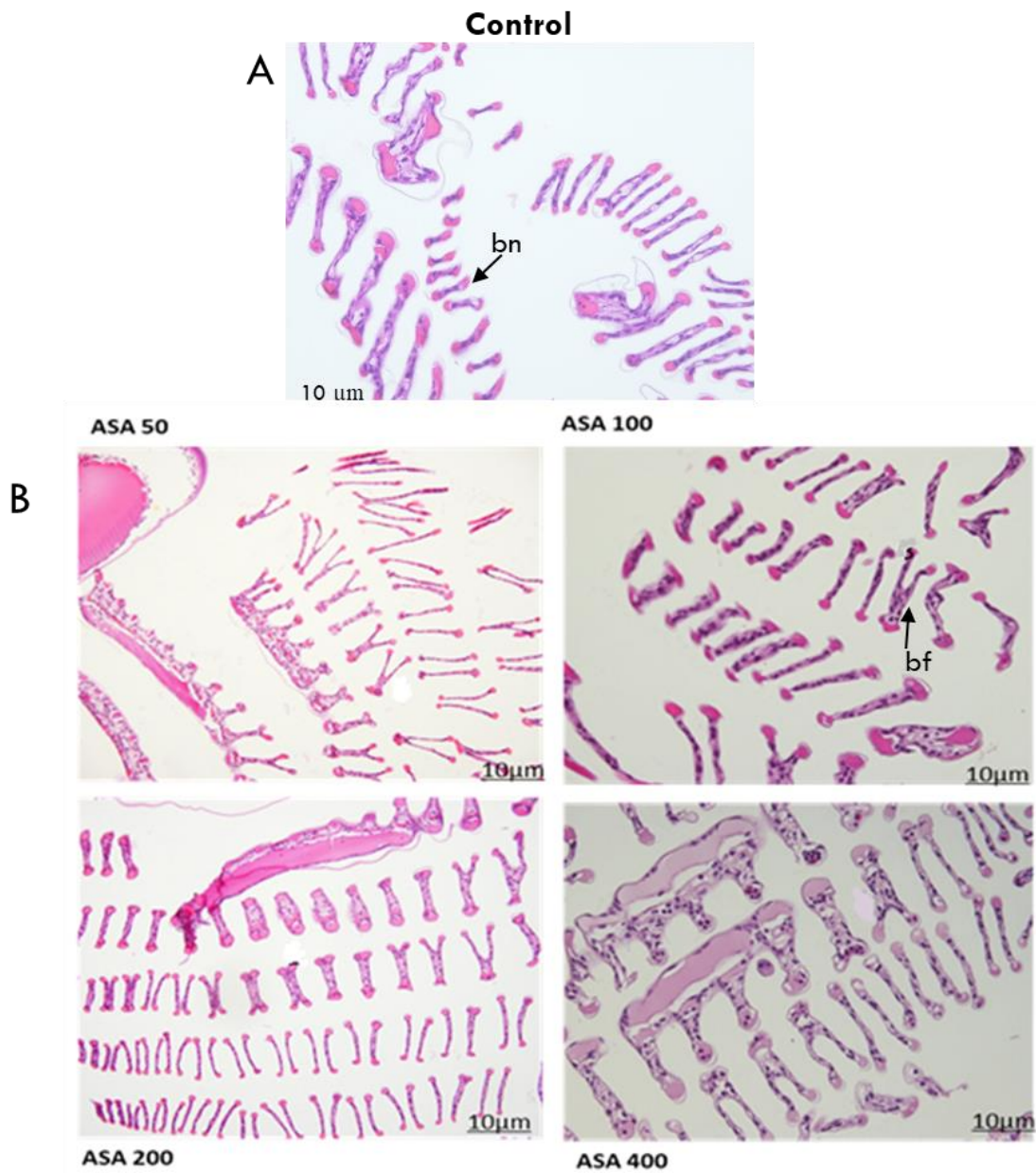


Figura 34. Corte histológico de branquias de camarón *L. vannamei*, donde se observa la atrofia branquial: A) Morfología branquial normal (bn) de un camarón de tratamiento Control al tiempo 0, y B) lámina branquial con lo que posiblemente es una atrofia, que muestra laminas fusionadas (bf) en camarones sometidos a las dosis de 50, 100, 200 y 400 de ASA.

7.2.3 Expresión relativa de genes *GPx*, *CAT*, *SOD*, y *COX*

La expresión relativa de genes de enzimas antioxidantes solo se hizo para el tratamiento Control y el de ASA100. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos en todos los genes analizados, habiendo efecto significativo del alimento, el tiempo e interacción de estas dos variables, sobre los genes *GPx*, *CAT*, *SOD* y *COX*. Respecto a *GPx*, se observó una mayor expresión relativa al tiempo 6 h en ASA100, que fue significativamente diferente a los demás tratamientos (Figura 35). Sobre *CAT* se observó que la mayoría de los tratamientos tuvieron expresión relativa baja, con excepción de los tratamientos ASA100 a las 0 h y ASA100 a las 6 h, los cuales tuvieron la mayor expresión relativa (4.4 y 4.8 respectivamente) (Figura 36). En cuanto a *SOD* se observó que Control a las 6 h (5.2), Control a las 3 h (5.8), Control a las 24 h (9.8) y con la mayor expresión en los organismos del tratamiento Control a las 12 h (12.8), que fueron diferentes de los demás (Figura 37). Respecto a *COX* se observó que la mayoría de los tratamientos, en todos los tiempos, tuvieron expresiones relativas bajas, que fueron significativamente diferentes de los tratamientos ASA100 al tiempo 0 h (5.5) (Figura 38).

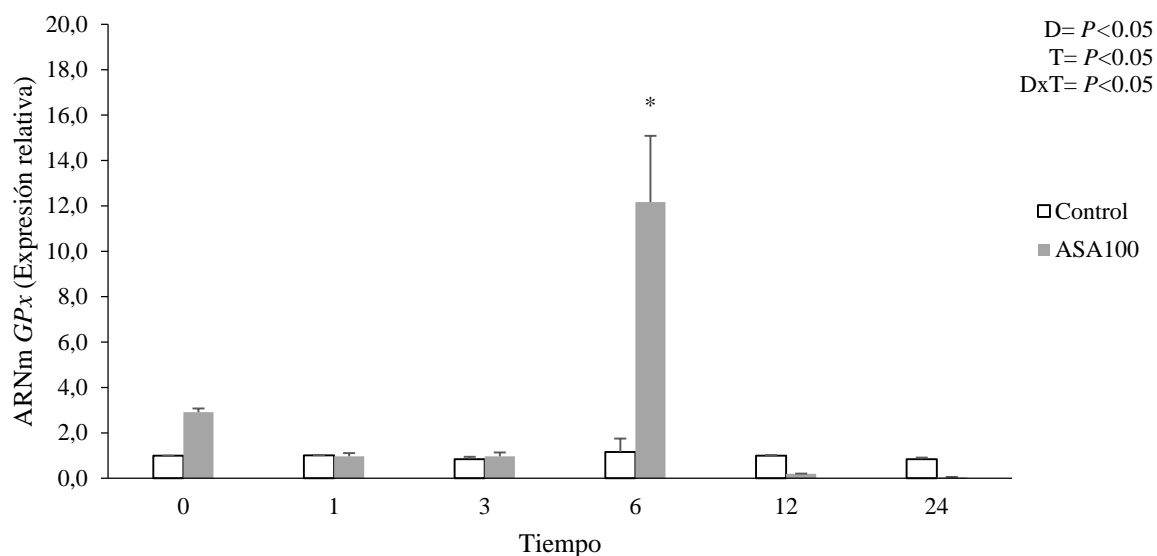


Figura 35. Expresión de ARNm de *Glutación peroxidasa* en hepatopáncreas de camarones. Medias \pm error estándar (n=3). ANOVA bifactorial, Dosis= D, Tiempo= T, interacción= D \times T. Asterisco sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

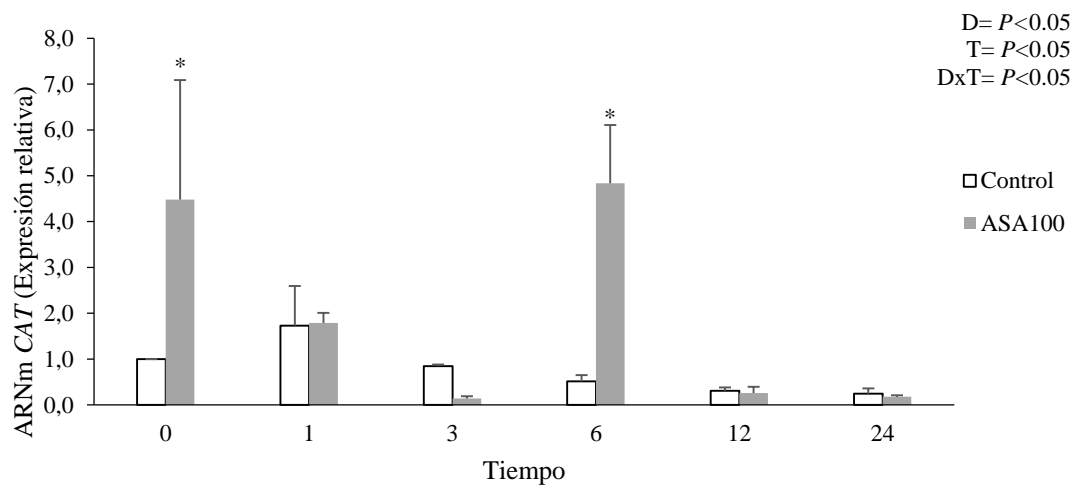


Figura 36. Expresión de ARNm de *Catalasa* en hepatopáncreas de camarones. Medias \pm error estándar (n=3). ANOVA bifactorial, Dosis= D, Tiempo= T, interacción= D \times T. Asterisco sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

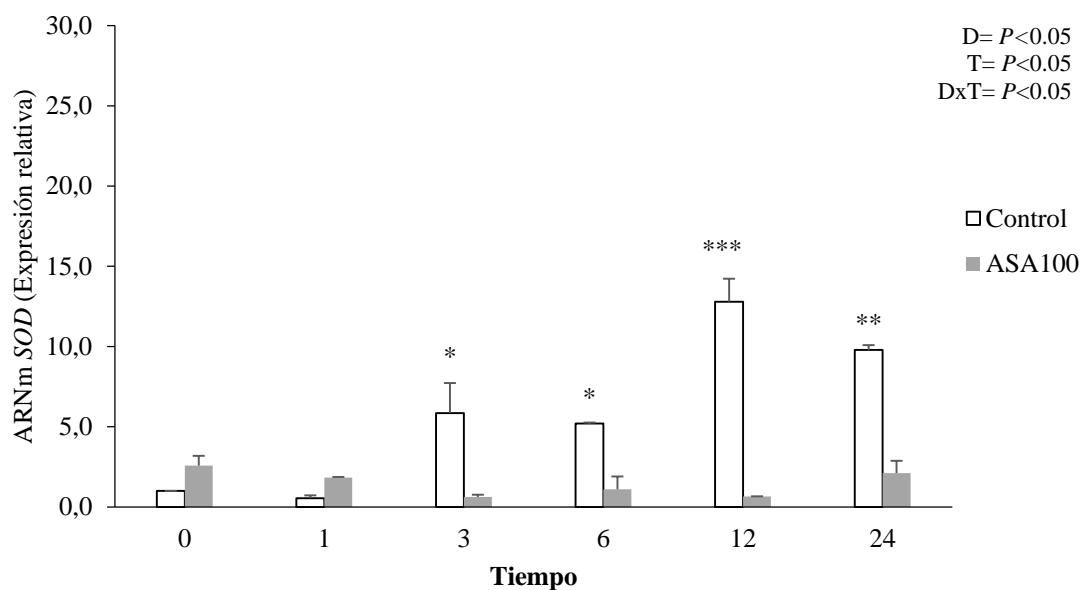


Figura 37. Expresión de ARNm de *Superóxido dismutasa* en hepatopáncreas de camarones. Medias \pm error estándar (n=3). ANOVA bifactorial, Dosis= D, Tiempo= T, interacción= D \times T. Asterisco sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

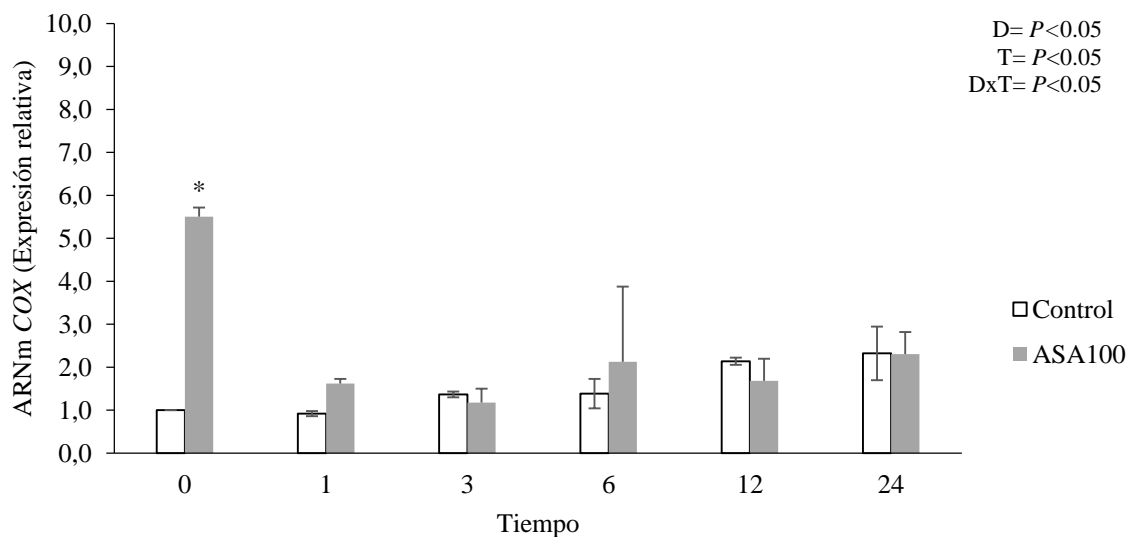


Figura 38. Expresión de ARNm de *Ciclooxigenasa* en hepatopáncreas de camarones. Medias \pm error estándar (n=3). ANOVA bifactorial, Dosis= D, Tiempo= T, interacción= D \times T. Asterisco sobre la barra indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

7.3. Evaluación del efecto de un inhibidor de ciclooxigenasas sobre la producción de prostaglandinas y la supervivencia en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.

7.3.1 Respuesta al reto de estrés

Durante el bioensayo de estrés, la supervivencia fue del 100% para los camarones no estresados con o sin ASA, pero para los controles estresados fue de 89%, mientras que los camarones alimentados con ASA tuvieron supervivencia de 100% cuando se sometieron al estrés (Figura 39). En el tratamiento Control no estresado, no hubo camarones con abdomen blanquecino, pero se encontró 53.3% con esta condición en el tratamiento Control estresado y 73.3% de los camarones en el tratamiento ASA estresados, mientras que solo 11.1% de los camarones no mostraron respuesta después del estrés en el tratamiento control (Tabla XXVI).

Tabla XXVI. Supervivencia y respuesta al estrés de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA

| | Control | | ASA | |
|--|---------|------|-----|------|
| | SE | E | SE | E |
| Supervivencia después del estrés (%) | 100 | 88.8 | 100 | 100 |
| Coloración blanca (%) | 0 | 53.3 | 0 | 73.3 |
| Camarones sin respuesta post-reinmersión en agua (%) | 0 | 11.1 | 0 | 0 |

Valores se muestran en medias, sin error estándar (n=1 por tratamiento)

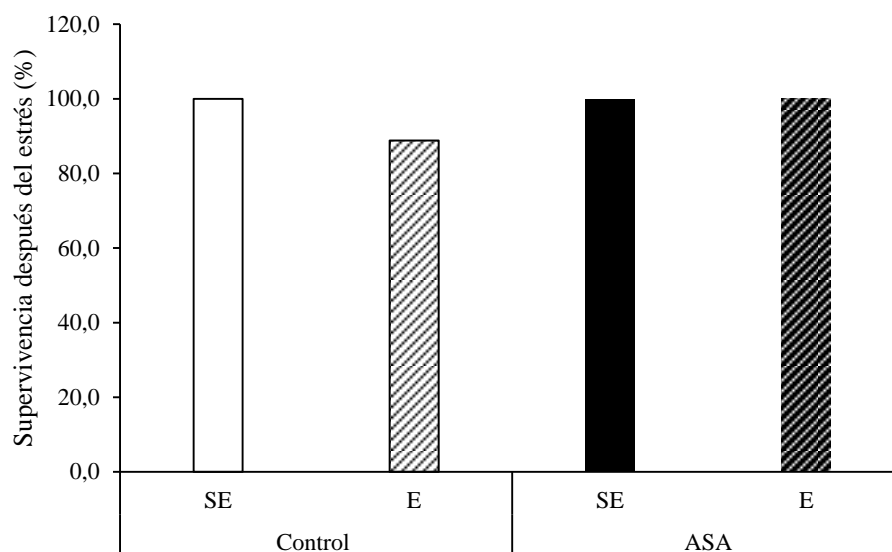


Figura 39. Supervivencia (%) de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA. Valores se muestran en media (n=1 por tratamiento).

7.3.2 Variables bioquímicas en camarón

El estrés afectó los niveles de carbohidratos, glucosa y lactato en hepatopáncreas de camarón (HP), independientemente de ASA. Los carbohidratos (24 ± 1.8 vs. 33 ± 4.0 mg/g) y glucosa (7.1 ± 2.9 vs. 15.4 ± 6.5 mg/g) fueron significativamente más bajos en los camarones estresados en comparación con los controles, mientras que el lactato fue más alto en los camarones estresados en comparación con los controles (1.4 ± 0.4 vs. 0.65 ± 0.2 mg/g). El ASA solo afectó los niveles de proteína total en HP, con niveles significativamente más bajos en camarones alimentados con el alimento suplementado con ASA en comparación con el alimento control (261 ± 40.7 vs. 500.6 ± 89.0 mg/g) (Tabla XXVII).

7.3.3 Lípidos en camarón

El porcentaje de ácidos grasos en las branquias solo tuvo diferencias significativas en los ácidos grasos 16:0 existiendo efecto por el alimento y por el estrés, donde los valores más bajos se encontraron en los organismos de los tratamientos ASA sin estrés y con estrés (10.8 y 11.0 %), mientras que el valor más alto se encontró en los organismos del tratamiento Control sin estrés (11.8%). La sumatoria de ácidos grasos saturados fue significativamente diferente entre los tratamientos, donde los organismos de ASA con estrés tuvieron el valor más bajo (21.7%), siendo diferente del tratamiento Control sin estrés, el cual tuvo el valor más alto (23.4%) (Tabla XXVIII).

Tabla XXVII. Variables bioquímicas (mg/g de materia seca) en músculo y hepatopáncreas de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA.

| | Control | | ASA | | ANOVA | | |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------|----|-----|
| | SE | E | SE | E | A | E | AxE |
| Hepatopáncreas | | | | | | | |
| Carbohidratos | 33.0 ± 4.0 ^b | 27.0 ± 3.9 ^{ab} | 29.6 ± 3.9 ^{ab} | 24.0 ± 1.8 ^a | * | * | NS |
| Proteínas | 500.6 ± 89.0 ^c | 480.9 ± 144.2 ^{bc} | 317.0 ± 24.8 ^{ab} | 261.0 ± 40.7 ^a | * | NS | NS |
| Lípidos | 319.1 ± 51.8 | 427.2 ± 90.1 | 388.7 ± 85.0 | 427.1 ± 74.2 | NS | NS | NS |
| Lactato | 0.7 ± 0.2 ^{ab} | 1.4 ± 0.4 ^b | 0.6 ± 0.2 ^a | 1.0 ± 0.4 ^{ab} | NS | * | NS |
| Glucosa | 12.5 ± 6.5 ^{ab} | 7.1 ± 2.9 ^a | 15.4 ± 6.5 ^b | 8.6 ± 2.6 ^{ab} | NS | * | NS |
| Músculo | | | | | | | |
| Carbohidratos | 36.2 ± 7.8 | 35.9 ± 13.6 | 44.2 ± 3.5 | 27.3 ± 5.03 | NS | NS | NS |
| Proteínas | 485.8 ± 11.8 ^a | 545.4 ± 49.0 ^b | 484.2 ± 21.1 ^a | 539.0 ± 55.4 ^b | NS | * | NS |
| Lípidos | 43.0 ± 3.6 ^c | 19.4 ± 2.8 ^a | 29.2 ± 4.4 ^b | 41.4 ± 4.5 ^c | NS | * | * |
| Lactato | 0.05 ± 0.01 | 0.08 ± 0.05 | 0.1 ± 0.07 | 0.06 ± 0.06 | NS | NS | NS |
| Glucosa | 13.1 ± 1.6 | 12.8 ± 1.3 | 13.5 ± 1.5 | 13.1 ± 1.8 | NS | NS | NS |

A = ASA; AxE = Interacción, SE, sin estrés; E = Estrés. Medias ± desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05). NS=No significativa (P>0.05). * Se encontró diferencia significativa (P<0.05).

7.3.4 Contenido de PGEM y LOOH en camarones

Sobre los niveles de PGEM en las branquias (Figura 40), se encontraron diferencias significativas entre tratamientos por tratamiento y por la interacción tratamiento y estrés.

Los niveles de PGEM fueron más bajos en los organismos alimentados con ASA sin estrés ($3.83 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{mg}$), seguido de los organismos del tratamiento Control sin estrés ($4.5 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{mg}$), seguido de los organismos alimentados con ASA estresados ($6.60 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$), y los valores más altos en los organismos del tratamiento control estresados ($10.3 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{mg}$).

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el contenido de los hidroperóxidos (LOOH), por interacción entre tratamiento y estrés, observándose una menor concentración en los organismos del tratamiento Control sin estrés ($48.7 \mu\text{g}/\text{mg}$), un valor intermedio en los del ASA sin estrés ($60.4 \mu\text{g}/\text{mg}$) y las concentraciones más altas en los organismos de los tratamientos ASA con estrés ($64.8 \mu\text{g}/\text{mg}$) y Control con estrés ($67.1 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Figura 41).

Tabla XXVIII. Contenido de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en branquias de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA.

| | Control | | ASA | | P | | |
|-----------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----|----|-----|
| | SE | E | SE | E | A | E | AxE |
| 14:0 | 0.30 ± 0.05 | 0.25 ± 0.01 | 0.24 ± 0.05 | 0.22 ± 0.10 | NS | NS | NS |
| 16:0 | 11.85 ± 0.09 ^b | 11.36 ± 0.21 ^b | 11.04 ± 0.38 ^a | 10.78 ± 0.20 ^a | * | * | NS |
| 18:0 | 10.03 ± 0.50 | 9.52 ± 0.37 | 9.58 ± 0.64 | 9.59 ± 0.68 | NS | NS | NS |
| 16:1n-9 | 0.87 ± 0.16 | 1.05 ± 0.05 | 1.05 ± 0.17 | 1.03 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| 16:1n-7 | 0.96 ± 0.03 | 0.86 ± 0.04 | 0.83 ± 0.03 | 0.81 ± 0.06 | NS | NS | NS |
| 18:1n-9 | 13.67 ± 0.77 | 13.16 ± 0.26 | 12.77 ± 0.48 | 13.04 ± 0.74 | NS | NS | NS |
| 18:1n-7 | 3.73 ± 0.08 ^b | 3.41 ± 0.05 ^{ab} | 3.44 ± 0.01 ^{ab} | 3.36 ± 0.09 ^a | NS | * | NS |
| 18:2n-6 | 10.71 ± 0.28 | 10.41 ± 0.04 | 10.43 ± 0.51 | 10.56 ± 0.52 | NS | NS | NS |
| 18:3n-3 | 1.02 ± 0.19 | 0.93 ± 0.04 | 0.88 ± 0.14 | 0.86 ± 0.20 | NS | NS | NS |
| 20:4n-6 | 3.33 ± 0.61 | 3.99 ± 0.43 | 3.89 ± 0.34 | 3.84 ± 0.73 | NS | NS | NS |
| 20:5n-3 | 13.64 ± 1.37 | 13.60 ± 0.39 | 13.75 ± 0.47 | 13.94 ± 0.69 | NS | NS | NS |
| 22:6n-3 | 15.91 ± 0.96 | 15.17 ± 0.51 | 15.88 ± 1.62 | 17.34 ± 1.73 | NS | NS | NS |
| Σ SAT | 23.41 ± 0.63 ^b | 22.36 ± 0.62 ^{ab} | 22.06 ± 0.43 ^{ab} | 21.74 ± 0.60 ^a | * | NS | NS |
| Σ MUFA | 25.37 ± 1.13 | 27.01 ± 0.88 | 26.61 ± 1.49 | 24.98 ± 1.29 | NS | NS | NS |
| Σ PUFA | 50.32 ± 1.70 | 49.56 ± 1.42 | 50.28 ± 1.97 | 52.20 ± 1.60 | NS | NS | NS |
| Σ HUFA | 35.14 ± 2.73 | 34.87 ± 1.23 | 35.57 ± 1.52 | 37.55 ± 1.16 | NS | NS | NS |
| Σ n-6 | 16.75 ± 0.20 | 16.91 ± 0.32 | 16.95 ± 0.60 | 17.19 ± 0.17 | NS | NS | NS |
| Σ n-3 | 33.57 ± 1.57 | 32.64 ± 1.11 | 33.32 ± 1.48 | 35.01 ± 1.49 | NS | NS | NS |
| n-3/n-6 | 2.00 ± 0.08 | 1.93 ± 0.03 | 1.97 ± 0.06 | 2.04 ± 0.08 | NS | NS | NS |
| 22:6/20:5 | 1.17 ± 0.05 | 1.12 ± 0.00 | 1.16 ± 0.15 | 1.25 ± 0.17 | NS | NS | NS |
| 20:4/20:5 | 0.24 ± 0.02 | 0.29 ± 0.02 | 0.28 ± 0.02 | 0.27 ± 0.04 | NS | NS | NS |

A = ASA; AxE = Interacción, SE, sin estrés; E = Estrés. Medias ± desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05). NS=No significativa (P>0.05). * Se encontró diferencia significativa (P<0.05).

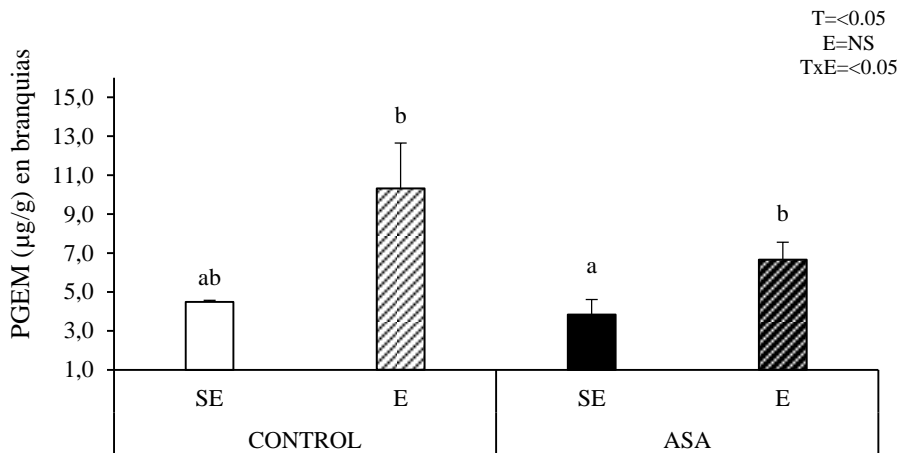


Figura 40. Concentración de PGEM en branquias de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA. Medias \pm error estándar ($n=3$). ANOVA bifactorial, E = Estrés; A = ASA; AxE = Interacción, NS=No significativa ($P>0.05$). Letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$).

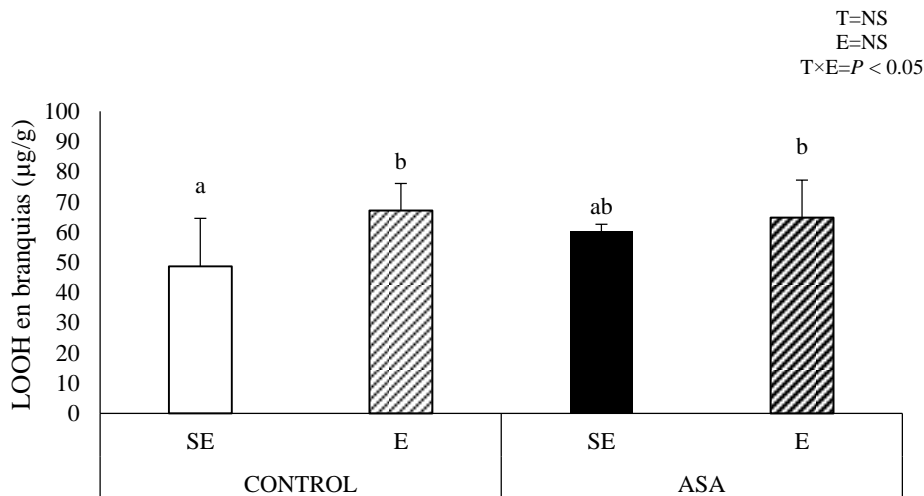


Figura 41. Concentración de LOOH en branquias de camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA. Medias \pm error estándar ($n=3$). ANOVA bifactorial, E = Estrés; A = ASA; AxE = Interacción, NS=No significativa ($P>0.05$). Letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$).

7.3.5 Análisis de PCA de resultados

Se realizó un análisis de PCA entre supervivencia durante el estrés, coloración blanca, contenido de PGEM, LOOH y ácidos grasos en branquias, y variables bioquímicas en hepatopáncreas. Tres factores tuvieron valores propios ≥ 1.0 y juntos representaron el 100% de la variación total. Las variables que fueron ≥ 0.7 y positivas en el primer factor fueron supervivencia, ARA, EPA y DHA en branquias, y glucosa en hepatopáncreas, mientras que las que fueron negativas fueron coloración blanca, PGEM en branquias y lípidos y lactato en hepatopáncreas, y juntos representaron el 65% de la variación. En el segundo factor, los carbohidratos y las proteínas en hepatopáncreas se asociaron positivamente y representaron el 23.4% de la variación. En el tercer factor, solo los hidroperóxidos fueron superiores a 0.7 y representaron el 11.6% de la variación (Tabla XXIX).

Tabla XXIX. Factores y eigenvalores estimados por análisis de componentes principales de la interacción de lípidos (branquias), parámetros zootécnicos y variables bioquímicas (hepatopáncreas) en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Supervivencia | 0.856 | -0.375 | 0.355 |
| Coloración blanca | -0.798 | -0.537 | 0.272 |
| PGEM branquias | -0.807 | 0.504 | -0.306 |
| ARA branquias | 0.917 | -0.242 | 0.316 |
| EPA branquias | 0.999 | 0.008 | -0.027 |
| DHA branquias | 0.985 | -0.042 | -0.166 |
| Carbohidratos HP | -0.399 | 0.291 | -0.011 |
| Proteínas HP | 0.629 | 0.777 | 0.870 |
| Lípidos HP | -0.200 | 0.977 | 0.078 |
| Glucosa HP | -0.704 | -0.632 | -0.324 |
| Lactato HP | 0.946 | 0.066 | -0.317 |
| LOOH branquias | -0.991 | 0.131 | -0.008 |
| Eigenvalor | 7.80 | 2.81 | 1.39 |
| Varianza total (%) | 65.01 | 23.41 | 11.58 |
| Eigenvalor acumulado | 7.80 | 10.61 | 12.00 |
| Acumulado (%) | 65.01 | 88.42 | 100.00 |

Factores >0.7 , se consideraron significativos.

La Figura 42 representa los resultados del PCA para los dos primeros factores que explican el 88.4% de la variación total. La supervivencia y el ARA en branquias se agruparon, con EPA y DHA en branquias y glucosa en HP. La coloración blanca se asoció con lípidos en HP. Los PGEM en branquias se asoció inversamente con la supervivencia y ARA en branquias, y lo mismo se observó entre glucosa y lactato en HP. Los hidroperóxidos se asociaron estrechamente con PGEM en las branquias.

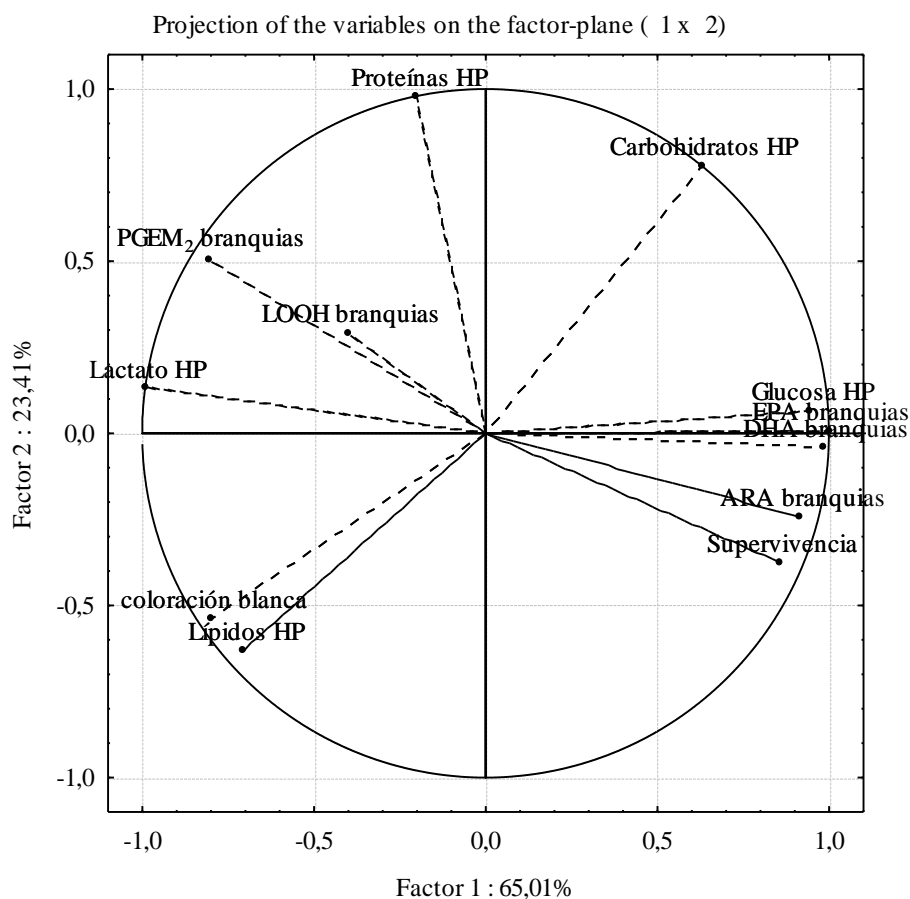


Figura 42. Análisis de componentes principales (factor 1 y 2) de la interacción de lípidos (branquias), parámetros zootécnicos y variables bioquímicas (hepatopáncreas) en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea en bioensayo producción de PGEM con ASA.

8. DISCUSIÓN

8.1 Evaluación del efecto de alimentos que contienen subproductos marinos sobre la producción de lípidos bioactivos en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.

8.1.1 *Bioensayo de crecimiento de camarón con alimentos experimentales*

Diferentes estudios han mostrado que los camarones alimentados con subproductos tienen un mejor desempeño, ya sea a nivel de crecimiento o de supervivencia. Las razones más comunes que se proponen para este mejor desempeño son los niveles de proteínas (Sudaryono *et al.*, 1995; Amaya *et al.*, 2007; Toyés-Vargas *et al.*, 2016), la composición de ácidos grasos, particularmente el contenido 22:6n-3 (Browdy *et al.*, 2006; Patnaik *et al.*, 2006), carotenoides (Toyés-Vargas *et al.*, 2016; Toyés-Vargas *et al.*, 2017), colesterol (Cheng y Hardy, 2004), fitosteroles (Basri *et al.*, 2012) y potenciadores de la palatabilidad o del crecimiento (Nunes *et al.*, 2006; Tantikitti, 2014). En concordancia, en el bioensayo 1, los camarones que se alimentaron con subproductos de calamar tuvieron mayor crecimiento que los alimentados con el alimento Control, mientras que los alimentados con Catarina tuvieron valores intermedios. Los camarones alimentados con calamar presentaron una mayor ingesta (casi el doble), lo que se tradujo en un FCA de 2.8 en comparación con FCA menores de 2 para los tratamientos de Control y Catarina (Tabla XII). El aumento del alimento consumido y del FCA de los organismos alimentados con calamar, también puede atribuirse a que el alimento con calamar fue menos estable en el agua que los otros dos alimentos, donde la lixiviación de los pellets en el agua lleva a la pérdida de nutrientes y con ello mayor alimento consumido aparente y un ineficiente factor de conversión alimenticia, aunque puede ser bajo, si el alimento contiene suficientes atractantes que mejoren el alimento consumido (Obaldo *et al.*, 2002). En otros estudios, la harina de calamar ha demostrado ser un fuerte atractante para los camarones (Mendoza *et al.*, 1997; Nunes *et al.*, 2006; Surest y Nates, 2011), estimulando el consumo de alimento y, en consecuencia, el crecimiento de los camarones (Browdy *et al.*, 2006; Cruz-Suárez *et al.*, 1992; Terrazas-Fierro *et al.*, 2010; Toyés-Vargas *et al.*, 2017). Los organismos alimentados con Catarina también presentaron un buen crecimiento y además un factor de conversión

alimenticia muy eficiente comparado con los alimentados con los organismos alimentados con calamar y Control, respecto a esto Civera-Cerecedo *et al.* (2011) sustituyeron la harina de pescado al 25, 50, 75 y 100% por harina de subproductos de almeja Catarina en alimento para camarón *L. vannamei*, concluyendo que el uso de esta harina hasta un 50% de inclusión, puede ser una alternativa eficiente sin tener efectos adversos en el crecimiento del camarón y aumentando la digestibilidad del alimento.

Hubo una acumulación significativamente mayor de proteínas en hepatopáncreas de camarones alimentados con el alimento Control (Tabla XXII), sin diferencias significativas en el músculo (Tabla XIX) o en el alimento (Tabla XIII). El crecimiento reducido de los camarones alimentados con el alimento Control, junto con niveles más altos de proteína en hepatopáncreas, podría indicar una transferencia menos eficiente de proteína de hepatopáncreas al músculo en este grupo. Esto podría estar asociado al tipo de fosfolípidos en el alimento Control, ya que algunos fosfolípidos interactúan con las proteínas para su absorción y movilización a través de la hemolinfa en forma de lipoproteínas (Yepiz-Placencia *et al.*, 2000). Mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles totales de fosfolípidos del alimento (Tabla XIII), sí hubo diferencias importantes de los ácidos grasos (Tabla XIV), los cuales varían en relación al tipo de fosfolípidos. Los diferentes tipos de fosfolípidos también pueden afectar la supervivencia (D'Abramo *et al.*, 1981) y la muda (Coutteau *et al.*, 1996), dada su variabilidad de ácidos grasos y la potencial producción de eicosanoides, diacilglicéridos y fosfoinosítidos como se ha encontrado en peces y otros vertebrados (Tocher *et al.*, 2008), o incluso como antioxidantes naturales (Saito e Ishihara, 1997; Tocher *et al.*, 2008; Choe y Min, 2009). Como consecuencia, Coutteau *et al.* (1996) propusieron que la interacción binaria (o mayor) de los componentes bioquímicos de los ingredientes debería considerarse para la producción de alimentos funcionales. A futuro, se recomienda analizar también la composición de fosfolípidos y aminoácidos esenciales en las harinas y los alimentos ya fabricados, ya que, es muy probable que los efectos positivos que se observaron en el rendimiento del cultivo pudieran también estar relacionado con los aminoácidos esenciales.

Al respecto de los ácidos grasos, anteriormente se había reportado que la harina de vísceras de calamar tenía niveles muy altos de DHA (22:6n-3) y fosfolípidos (Toyes-Vargas *et al.*, 2016; Toyes-Vargas *et al.*, 2017). Aquí se encontraron niveles altos de fosfolípidos en los calamares analizados, pero el contenido de 22:6n-3 fue mucho más bajo (7.3%) que lo reportado anteriormente (Tabla XIII). Los niveles más bajos de 22:6n-3 podrían ser una consecuencia de la variación estacional: los calamares utilizados por Toyes-Vargas *et al.* (2016; 2017) fueron capturados en mayo, mientras que los utilizados en este experimento fueron capturados en noviembre. Al respecto, Morales-Bojórquez *et al.* (2001) reportaron que esta especie de calamar era sexualmente activa de enero a mayo en el Golfo de California, con muy baja actividad en noviembre. Las gónadas femeninas de los calamares son ricas en lípidos, fosfolípidos y triacilglicéridos (Phillips *et al.*, 2002) y tienen más del 40% de 20:5n-3 y 22:6n-3 (Saito *et al.*, 2014); la razón por la que se encontró poco DHA (HUFA n-3) en los calamares en el presente trabajo, podría ser la ausencia de gónada por ser capturados en noviembre. Otra alternativa es que la alimentación de los calamares cambie en el mes de noviembre, y dado que estamos usando subproductos que son principalmente glándulas digestivas, las diferencias en la alimentación podrían modificar los ácidos grasos y la composición en general de lípidos (Phillips *et al.*, 2003). El músculo o manto de calamar es muy rico en HUFA n-3; se ha reportado que contienen más del 30% de DHA (22:6n-3) en diferentes especies, sin embargo, aquí no fue utilizado (Takama *et al.*, 1999).

Es importante señalar que las diferencias en contenido de HUFA por presencia de gónada o tipo de alimentación es común en muchas especies, incluyendo a la sardina, la cual es la fuente más importante de harina de pescado; sin embargo, su composición de ácidos grasos no es analizada en cada lote. Esto eventualmente, podría afectar los resultados de crecimiento y desempeño en general de camarones y otros organismos de acuicultura.

8.1.2 Respuestas a reto de estrés en camarones alimentados con alimentos experimentales

Al final del bioensayo de 60 días donde se evaluó crecimiento y supervivencia en camarones alimentados con alimentos que contenían subproductos marinos, se aplicó un estrés agudo por manejo. El estrés usado aquí es común durante el cultivo de camarón, por ejemplo, durante la transferencia de camarones entre estanques para modificar densidad o para hacer biometrías de los camarones. Los camarones son capturados con una red y luego son concentrados y expuestos al aire mientras son transportados a estanques. Cuando los camarones van a ser cosechados, se hace un manejo similar. Si los camarones mueren antes de ser enhielados su coloración y consistencia cambia, y ya no pasan la prueba de calidad para el consumidor (Licona, 2015). Algunos camarones presentan después de un estrés de manejo como el anterior, una coloración blanquecina del abdomen, que generalmente es atribuida a una disminución del pH y a la acumulación de lactato, y que por lo general puede ser reversible si el estrés es corto (Thebault y Raffin, 1991; Robles-Romo *et al.*, 2014). Sin embargo, si el estrés es más prolongado, se ha observado histológicamente que la coloración blanquecina progresa a muerte celular (Neil, 2012), necrosis y, finalmente, el camarón así estresado muere (Rigdon y Baxter, 1970).

En el presente trabajo, la supervivencia tras el estrés fue ligeramente menor en los camarones alimentados con el alimento Control (91%) (Figura 18) y no se detectaron diferencias en supervivencia entre los camarones alimentados con subproductos (100%). Además de la supervivencia, se tomó nota de los camarones que no respondían al contacto con una vara después del estrés, aún si estaban vivos, así como de aquellos que presentaron una evidente coloración blanca del abdomen. No se observaron diferencias significativas en el número de camarones con manchas blancas entre los tres grupos (Figura 19). Sin embargo, se observó una disminución significativa de los camarones que no presentaron respuesta después del estrés (Figura 20) en el grupo alimentado con almeja (36%), seguido por Calamar (50%), y con el grupo Control con la mayor cantidad de camarones no-responsivos (79%). La falta de respuesta en los camarones post-estrés se puede deber al agotamiento de reservas bioquímicas para producir una respuesta, mientras que la coloración blanca podría estar más asociada a los niveles altos de lactato. Mientras que los

resultados de composición bioquímica en músculo y hepatopáncreas no fueron concluyentes, se observó una asociación entre la coloración blanca, la supervivencia y la cantidad de lactato en hepatopáncreas cuando los resultados se analizaron usando un análisis PCA (Figura 28A). Así mismo, se observó que en los camarones alimentados con calamar y con almeja Catarina, hay un comportamiento distinto al de los camarones del grupo Control, en los cuales hubo mayores niveles del contenido de lípidos en hepatopáncreas y músculo, lo cual sugiere que en este grupo hay mayor uso de carbohidratos sobre lípidos, un proceso esperado durante un evento de hipoxia, mientras que en los camarones de los tratamientos de calamar y Catarina se usan más lípidos que carbohidratos durante el estrés; respecto a esto se ha sugerido que cuando hay un incremento de demanda de energía, ocurre un incremento de un sustrato metabólico, y al parecer los carbohidratos no parecen ser esta fuente cuando camarones de *L.vannamei* son sometidos a altas concentraciones de amonio, y un incremento del uso de lípidos para satisfacer las necesidades metabólicas, donde pueden tener la ventaja de proveer más energía que los carbohidratos o proteínas durante eventos de estrés (Racotta y Hernández-Herrera, 2000). Schmitt y Santos (1993) mencionan que la utilización de los lípidos por sobre los carbohidratos en la glándula digestiva de cangrejos *Chasmagnathus granulata* Dana expuestos al aire; resulta ser una estrategia ventajosa, debido a que durante una exposición aérea muchas especies de crustáceos muestran una acumulación de CO₂ que resulta en una acidosis respiratoria, entonces la producción de energía a través de los lípidos produce 30% menos CO₂ que cuando son usados los carbohidratos; tales cambios de lípidos reflejan un cambio a la oxidación de lípidos en lugar de glucosa, para reducir la acidosis.

En cuanto al contenido de ácidos grasos en el camarón, es posible que al no haber diferencias en el contenido de HUFA tanto en la fracción de acilglicéridos y fosfolípidos del músculo, es un indicador de que los niveles de HUFA en los alimentos son suficientes para tener efectos positivos en el desempeño del camarón, como lo fue la supervivencia post estrés. Aunque el contenido de ARA, en los alimentos fue diferente con un mayor contenido en Control y Catarina, y menor en el alimento con calamar, esto no se reflejó en

el contenido de este ácido graso en la fracción de acilglicéridos, ya que se observó mayor contenido en los organismos estresados alimentados con el alimento con calamar, lo que puede indicar una mejor respuesta inmune (Aguilar *et al.*, 2012), solo mostraron mayor contenido de EPA y HUFA en la fracción de fosfolípidos. Los ácidos grasos en la fracción de fosfolípidos se encuentran normalmente conservados ya que cumplen funciones esenciales en la membrana, sin embargo, en peces se ha observado que cuando los HUFA se encuentran en cantidades altas en el tejido y son suficientes para cumplir las funciones vitales del organismo, el exceso de estos ácidos grasos puede ser usado en la β -oxidación para la producción de energía (Sargent *et al.*, 2002; Stubhaug *et al.*, 2006). La modificación del contenido de ácidos grasos en la fracción de fosfolípidos, ya se había observado en el caso de camarón, y a diferencia de los peces y ostiones, indica que los camarones están acumulando ácidos grasos provenientes del alimento en la membrana (Palacios *et al.*, 2001).

Durante un evento de estrés ocurre un aumento de la demanda de carbohidratos, específicamente glucosa durante el estrés, así como la oxidación del exceso de lactato durante la recuperación exige un aumento en el metabolismo energético y, por lo tanto, una mayor producción de ROS. Zenteno-Savín *et al.* (2006) encontraron que los ROS en hepatopáncreas de camarón estuvieron más altos después de 1 hora en recuperación después de haber aplicado un estrés por hipoxia, pero en el músculo estuvieron más altos 2 horas después de la recuperación, junto con una mayor capacidad antioxidante de las enzimas. Un aumento desmedido de los niveles de ROS puede llegar a producir la oxidación de los lípidos de membrana (Gutteridge, 1995), proteínas (Cabiscol Català *et al.*, 2000) e incluso ADN (Higuchi, 2003). El aumento de ROS, si no se controla, puede inducir apoptosis y necrosis (Chandra *et al.*, 2000; Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2019); ambos procesos regulados por PG. Los factores de necrosis tumoral (TNF) pueden ser regulados a través del suministro de PGE₂ exógeno, habiendo una reducción de la actividad de TNF y una disminución de la acumulación de transcritos de TNF *in situ* (Kunkel *et al.*, 1988).

En el presente trabajo, se encontró que los camarones del grupo de Control, que tuvieron una recuperación más baja después del estrés por manipulación, tuvieron una

mayor acumulación de PG después del estrés, mientras que no se encontraron diferencias en los camarones alimentados con almeja o calamar en relación con el estrés (Figura 24). Los hidroperóxidos presentaron un comportamiento similar: aumentaron en los camarones estresados de todos los tratamientos, pero el aumento solo fue significativo en el grupo Control (Figura 25). Los hidroperóxidos incrementan cuando se produce oxidación de ácidos grasos, en particular de los HUFA que se encuentran unidos a los fosfolípidos de membrana. La oxidación de los HUFA de la membrana puede a su vez, afectar a otros componentes de la célula. Por ejemplo, se observaron niveles más altos de COP (7-OH, 7-CETO, epoxicolesterol y colestanoetriol) en camarones alimentados con el alimento Control y estresados. Los COP que se encontraron aquí en mayores cantidades son los más comunes productos de oxidación del colesterol (Osada *et al.*, 1993; Brzeska *et al.*, 2016). Estos aumentos no fueron tan evidentes en camarones estresados y alimentados con almeja, donde de hecho, disminuyeron algunos COP en camarones estresados, aún sí la almeja contenía más HUFA y era, por tanto, más susceptible a la oxidación. La disminución de COP en camarones alimentados con almeja podría ser resultado de los niveles de pigmentos (*i.e.* astaxantina) u otros antioxidantes (*i.e.* HUFA, polifenoles y flavonoides) en la almeja, como se observa por la acumulación en hepatopáncreas (Tabla XX).

En el otro producto de oxidación, el 8-isoprostano, que es un indicador de peroxidación lipídica, no se encontraron diferencias significativas, pero sí una tendencia a una mayor concentración en los camarones alimentados con el alimento control (Figura 26), mientras los niveles más bajos se observaron en los camarones alimentados con calamar. Aún si no fue significativo, sí se observó un ligero incremento en el 8-isoprostano de organismos estresados de los tres tratamientos.

En los camarones estresados, hubo un aumento en la expresión genética relativa de *GPx* y *CAT* en hepatopáncreas de camarones alimentados con Catarina (Figura 27 A y B). García-Triana *et al.* (2010), estudiaron el efecto de la expresión del gen *SOD* y la actividad enzimática de *SOD* en condiciones de normoxia, hipoxia y reoxigenación en *L. vannamei*, ellos encontraron que la expresión relativa del gen *SOD* se sobreexpresó más en hepatopáncreas que en branquias, y estas expresiones estuvieron menores durante la

hipoxia (comparado con normoxia y reoxigenación) la cual duró 6 horas; concluyendo que la expresión de genes está relacionada al tipo de tejido y depende de la variación de radicales de O₂ producidos. Debe de considerarse que la duración del estrés tiene que ver en si hay una sobreexpresión o subexpresión de genes, ya que en el presente trabajo el efecto de estrés fue de 15 minutos y el evaluado por García-Triana *et al.* (2010) fue de 6 horas; Gao *et al.* (2012) mencionan que al haber un efecto de estrés crónico la expresión de genes se encuentra subexpresada, mientras que cuando aplicaron un estrés agudo de salinidad la expresión de genes estuvo sobreexpresada como un mecanismo de protección inmune inhata en *L.vannamei*, cuando los camarones son sometidos a estrés agudo la actividad de algunas enzimas antioxidantes son activadas inicialmente, mientras que hay una sobreexpresión de genes relacionados (Yeh *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018).

Xu *et al.* (2018) obtuvieron un efecto similar en hepatopáncreas y hemolinfa de camarones *L. vannamei* al aplicar choques fríos y 3 horas de exposición al aire. Liu *et al.* (2015) observaron que 40 minutos de exposición al aire y al menos 3 horas de tiempo de resubmersión, disminuyen significativamente la competencia antioxidante total, y concluyeron que los antioxidantes no enzimáticos (*i.e.* HUFA, pigmentos, polifenoles y flavonoides) se pueden consumir en el hepatopáncreas durante la exposición al aire y que el tiempo máximo durante el cual los camarones pueden sobrevivir a la exposición al aire y aún recuperarse cuando se vuelven a sumergir al agua, puede estar entre los primeros 10 minutos y 30 minutos en camarones *L. vannamei* de un peso similar al del presente trabajo (13.5 g y 12 g respectivamente). Sun *et al.* (2015) concluyeron que la transcripción de estos genes cambia en hepatopáncreas en *Macrobrachium nipponense* como resultado del estrés oxidativo, incluidos los genes sobrerregulados que están implicados en la actividad oxidorreductasa y el proceso de reducción de la oxidación, tal y como se observó con una mayor expresión relativa de *GPX* y *CAT* durante el estrés. Estas expresiones de genes se encuentran sobrerreguladas durante el aumento de la presencia de ROS. Sin embargo, el alimento con harina de calamar tenía más pigmentos que el control, y los camarones alimentados con almeja acumularon mas pigmentos en hepatopáncreas que el control, lo que probablemente contrarrestó la producción de ROS. Es posible que los pigmentos u

otros compuestos antioxidantes del alimento protejan en cierto grado las células del oxígeno, pero que el exceso de ROS provoque una sobre regulación de la expresión génica para contrarrestar el efecto oxidante producido por el estrés donde hay producción de ROS (Glaeser y Klug, 2005). Al respecto, se sabe que las almejas tienden a acumular metales como el zinc, el magnesio y el manganeso (Mendez *et al.*, 2006). Estos metales forman parte de la estructura de algunas enzimas antioxidantes (Marklund *et al.*, 1982). Curiosamente, se ha observado una mayor absorción de zinc en el intestino de organismos expuestos a PG (Song y Adham, 1978), lo cual podría explicar algunos efectos sobre las enzimas antioxidantes, independientemente de los pigmentos.

En el análisis de PCA, la mayoría de las variables asociadas al crecimiento se agruparon en la primera variable, que también contenía 8-isoprostano, SOD y 7 β -hidroxicolesterol, variables asociadas a la oxidación, mientras que la astaxantina esterificada y la astaxantina libre se asociaron negativamente, lo que sugiere una liberación de astaxantina esterificada para disminuir la oxidación. El segundo factor fue representado por los ácidos grasos en músculo y hepatopáncreas y varios COP, lo que sugiere un efecto por el alimento. El tercer factor agrupó las variables asociadas con el estrés, pero también LOOH y PG en las branquias. La Figura del análisis de PCA mostró que los niveles de PG estuvieron relacionados con una respuesta disminuida al estrés en los camarones, mientras que LOOH están más relacionados con la coloración blanquecina después del estrés. Estos factores son independientes de los parámetros de crecimiento, lo que indica que los camarones que crecieron más no fueron necesariamente más tolerantes al estrés de manejo. Esto es muy interesante, ya que indica que los alimentos que promueven un mejor crecimiento no están correlacionados con una mayor supervivencia durante el estrés y deben tomarse en cuenta en la nutrición y el cultivo de camarón, ya que podrían ser benéficos particularmente durante el control de la densidad, el registro del crecimiento y la cosecha.

En relación con la hipótesis planteada, se esperaba mayor supervivencia después de un estrés en los camarones alimentados con subproductos de harina de almeja y calamar, ya que, al tener mayor cantidad de pigmentos antioxidantes, la producción de ROS podía

reducirse por lo que también quedarían reducidos los COP, hidroperóxidos e isoprostanos, sin efecto sobre las PGEM. Observamos en camarones control post-estrés, un incremento significativo de PG y de hidroperóxidos en branquias, pero no de isoprostanos y COP. No hubo diferencias significativas de pigmentos, pero en los camarones alimentados con almeja, incrementó la expresión de *GPx* y *Catalasa*: este grupo también presentó la mejor recuperación post-estrés y menores niveles de FCA. Los camarones alimentados con calamar presentaron el mejor crecimiento y consumo de alimento; también presentaron valores más altos de ARA en los triglicéridos, pero esto no afectó los niveles de PGEM post-estrés.

8.2 Determinación de la dosis, el tiempo y la administración más adecuada de un inhibidor de ciclooxigenasas suministrado en el alimento y evaluar su efecto sobre la producción de prostaglandinas en camarones.

Los niveles de PGEM tuvieron variaciones dependiendo de la dosis suministrada y el tiempo que se dejó actuar el ASA (Figura 29). A las 0 horas no hay variaciones significativas de PGEM entre las diferentes dosis de ASA suministradas en el alimento a los camarones. Se observa que los niveles de PG en camarones no estresados o basales, son similares entre los distintos objetivos, como son los valores de PGEM en branquias de camarones cuando no son estresados: concentración de 4.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en peso seco de PG de control del bioensayo del objetivo 2 (Figura 24). Es necesario recalcar que la PGEM analizada aquí, es la suma de varias PG, dado que se analizan los metabolitos finales, por lo que se espera que los valores de PG analizadas individualmente, como, por ejemplo, por cromatografía de gases, sean más bajos y posiblemente si se hubieran analizado las PGEM de la serie 3. Por otro lado, cuando analizamos las PG en otros tejidos, observamos que las branquias presentaban mucha mayor concentración en comparación con músculo o hepatopáncreas (ver Anexo). Esto podría deberse a que las branquias están particularmente expuestas, por lo que se espera que reaccionen primero o rápidamente, pero también podría ser un efecto de ASA disuelta en agua afectando directamente las branquias. El alimento fue incluido en el experimento, pero dentro de bolsitas de tela a fin de evitar que fuera

ingerido, pero con la posibilidad de producir un efecto ya sea por estimulación de manejo, del alimento, o por lixiviación de ASA a partir del alimento. Al respecto, también se agregó ASA en un tratamiento paralelo, pero disuelta en el agua, tampoco se observaron diferencias significativas entre el ASA disuelta en agua y el Control sin ASA, aun cuando la dosis empleada fue mayor, de 200 mg/kg (ver Anexo). Por lo tanto, podemos concluir que el efecto del ASA no se debe a la posible lixiviación a estas concentraciones a partir del alimento, sino que surte efecto cuando se consume por el camarón.

Una vez transcurrida una hora de alimentación con distintos niveles de ASA, se observaron niveles más altos de PGEM para el ASA50, seguido del Control (sin ASA), luego del ASA-100 y con valores similares a los basales, de ASA200 y ASA400, pero también de los organismos ayunados. Al respecto, es interesante que los organismos del grupo Control incrementen las PG al recibir alimento, cosa que no sucede durante el ayuno. En humanos se sabe que los niveles de PG incrementan durante la alimentación, dado que se produce ácido para la digestión y este ácido daña células del tracto digestivo: Las PG se secretan para estimular la apoptosis y la generación de nuevas células después del alimento y tienen de esta forma, un efecto protector que se anula cuando las personas ingieren ASA (Hunt y Franz, 1981). En concordancia, se observó un fuerte incremento de *COX* cuando se administró el alimento con ASA a los camarones (Figura 38), lo cual sugiere que el organismo está tratando de sintetizar PG para neutralizar el efecto de ASA presente en la comida, que tienen un efecto inmediato sobre la síntesis de PG (segundos), una vida extremadamente corta (aproximadamente 30 segundos) debido a su inestabilidad química inherente, y ya posteriormente empieza la degradación, con el consecuente análisis de PGEM, que son derivados de PG más estables.

Es evidente que a partir del ASA-100, hubo una disminución de PG, probablemente por inhibición de *COX*, que, en el caso de crustáceos, se han detectado de varios tipos, como en mamíferos, pero no se sabe si el ASA afecta a todos los subtipos de *COX* (Eades y Waring, 2010). Al respecto, Freas y Grollman (1980) lograron inhibir PGE_2 en branquias de bivalvo *Modiolus demissus* con ASA e indometacina suministradas en una solución inyectada, al momento de ver la síntesis de PGE_2 en las branquias concluyen que estas PG

son producidas de una forma muy similar a la de los mamíferos, y esta puede ser inhibida por ASA ya que es un inhibidor de PGH sintasa universal; existen otros inhibidores de COX que han logrado inhibir la producción de PG, por ejemplo: en larvas de cípridos con indometacina (Knight *et al.*, 2000), en gónadas de *L. vannamei* y *L. stylirostris* con ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico, en gónadas de hembras de cangrejo de agua dulce *Oziothelphusa senex* con indometacina y ASA (Prameswari *et al.*, 2017). Aparentemente, la dosis de ASA50 no solo no fue suficiente para inhibir la COX y la subsecuente producción de PG, sino que aumentó las PG, tal vez por el efecto ácido del ASA sobre el tracto digestivo.

En los tiempos 1, 3, 6 y 24 h las dosis de ASA100 presentaron niveles intermedios de PGEM (Figura 29). En contraste, con la dosis de ASA200 los niveles de PGEM incrementaron después de 3 h, mientras que con ASA400 siempre permanecieron bajos. Aparentemente, la duración de acción de ASA200 es por debajo de 3 h en camarones, mientras que la dosis de ASA400 sigue activa después de 24 h, lo cual puede ser un resultado interesante para el manejo práctico de organismos durante desdoblamiento y cosecha. Al respecto, el efecto de ASA no está determinada por la vida media plasmática, si no por la vida media biológica del objetivo acetilado, unas pocas horas para células endoteliales, unos días para plaquetas (Schrör y Voelker, 2016). El pico máximo de acción de ASA se encontró entre las 4 y 8 h en experimentos *in vitro* en células plasma sanguíneo (Pedersen y FitzGerald, 1984). El efecto de ASA sobre la osmorregulación en larvas de peces alcanza su punto máximo entre los 20 y 60 minutos (Van Anholt *et al.*, 2004), pero el salicilato alcanza un pico máximo a las 5.5 horas con una dosis de 100 mg/kg de ASA en tilapias *Oreochromis mossambicus* (Van Anholt *et al.*, 2003). Lo anterior concuerda con los resultados de tiempo de acción obtenidos aquí, con algunas variaciones derivadas del número reducido de camarones usados para cada tiempo y concentración, dada la capacidad de la microplaca. Se recomienda utilizar más camarones para corregir las variaciones inherentes. Como aclaración, se desarrolló la técnica para medir salicilato en hemolinfa, pero no fue posible determinarlo debido a la contingencia sanitaria por el COVID-19 (ver Anexos).

Con el objetivo de evaluar si el ASA puede producir daño por sí mismo sobre los tejidos, debido a cambios de pH, por inhibición de secreción de PG, por la acidez del ASA, se analizó la apoptosis en distintos tejidos por medio de histología (Figura 31). La apoptosis es un proceso de muerte celular programado en células dañadas, pero se ha observado que hay una superposición entre la apoptosis y necrosis cuando hay una exposición a fármacos y que puede inducir a la muerte celular (Raes *et al.*, 2000). El daño apoptótico en los tejidos resultó en niveles bajos para la mayoría de los tejidos analizados (Figura 32). En comparación, por ejemplo, del daño apoptótico que se observa después de un estrés de temperatura en ostiones *Crassostrea gigas* donde en los machos las células espermáticas son fagocitadas por los hemocitos que entran en apoptosis cuando la temperatura aumenta a 28 °C y que podría ser una de las principales causas de altas tasas de mortalidad en esta especie por exposición a altas temperaturas (Rodríguez-Jaramillo, 2014). Los tejidos conjuntivo y branquial fueron los más afectados a una dosis de ASA200. Para el branquial no hubo suficiente muestra, pero se observó un efecto en la dosis de ASA100, mientras que hubo más daño en músculo con ASA400. Asimismo, se observaron láminas branquiales aparentemente fusionadas a las dosis de ASA400, 200, 100 y 50 (Figura 34), aún si no hubo diferencia entre las distintas concentraciones de ASA a diferentes tiempos en el área branquial de camarones (Figura 33). Daño a nivel de branquias en peces a causa de ASA ya se había reportado en distintas especies (Fernández y Mazón, 2003) y con mas detalle, en salmón *Salmo trutta fario* por Nunes *et al.* (2015), las cuales también presentaron daños histológicos como fusión de lamelas, hipertrofia y levantamiento epitelial; sin embargo, concluyeron que dichos daños no son específicos y son reversibles, siendo un mecanismo de adaptación de barrera para evitar o disminuir la absorción de ASA, ya que las lamelas reducen su área superficial y se incrementa la distancia de difusión. En el caso de las branquias, estas se consideran cruciales para los organismos acuáticos, ya que son el órgano más sensible a un cambio producido en el agua (Poleksic y Mitrovic-Tutundzic, 1994), en crustáceos son importantes para la respiración, excreción, balance ácido-base y regulación osmótica, son el primer órgano expuesto a contaminantes en el agua como fármacos y metales pesados (Wu *et al.*, 2009). En el presente trabajo, la administración de ASA no

indujo a una apoptosis marcada u otros daños deletéreos que pudieran llevar a la muerte del organismo.

En cuanto a los genes que expresan las enzimas antioxidantes se observó que el gen de *GPx* solamente se sobreexpresó a las 6 horas en el tratamiento con ASA100, valor que superó 11 veces al del Control, en ese tiempo, una sobreexpresión de genes *GPx* está relacionado con el incremento de la actividad enzimática de GPx, y que puede estar asociada a un mecanismo de actividad enzimática de otras enzimas sensibles a un estrés oxidativo (Hassan, 2003; Nunes *et al.*, 2015). Brzozowski *et al.* (2003) encontraron que el uso de ASA, así como otros NSAIDs, induce a isquemia en ratones, que lleva a la generación de radicales libres, donde mostraron que el uso de ASA provocó la generación de ROS y MDA en la mucosa gástrica de los animales, pero a diferencia de este trabajo mencionan que la expresión de los genes de *GPx* y *SOD* se suprimen, concluyendo que la enzima GPx reduce los hidroperóxidos a alcoholes menos reactivos y remueve los H₂O₂ que producen inflamación, donde las enzimas juegan un papel importante en los daños gástricos causados por el ASA. Dimitrovska *et al.* (2018) aplicaron estrés térmico en ratas diabéticas y tratamiento con ASA en el hígado, donde encontraron que en el hígado hubo una reducción de la actividad de las proteínas de shock térmico (HSP70), concentración de GHS (Glutación) y de la actividad de CAT, mientras que la actividad de la enzima GPx se incrementó, de igual forma pasó con el tratamiento con ASA, concluyendo que tanto el shock térmico como el ASA en ratones diabéticos son inductores fisiológicos y farmacológicos de la HPS70, elevando las defensas antioxidantes contra el estrés. Los genes de *CAT* se sobreexpresaron al tiempo 0 y al tiempo 6 en el tratamiento ASA100, mientras que en el Control no hubo sobreexpresión o reducción de la expresión enzimática. En plantas de maíz se observó una acumulación de transcritos de *CAT2* y *CAT1* cuando estas plantas fueron tratadas con ASA, lo cual no favoreció la germinación de las mismas, posiblemente al haber ASA un embrión no puede germinar debido a que no hay producción de ATP suficiente, al haber una generación de ROS en la mitocondria, lo que posiblemente indica que los transcritos de *CAT* incrementan para contrarrestar el estrés oxidativo causado por la actividad metabólica estimulada en la célula (Guan y Scandalios, 1995); la actividad

enzimática de CAT es alta en invertebrados, indicando la importancia de su rol en la protección antioxidante en estos organismos, la catalasa puede estar sobreexpresada y con un inherente incremento de su actividad, en respuesta al exceso de peróxidos de oxígeno formados (Piedade *et al.*, 2020). Respecto a la sobreexpresión de los genes de *SOD* en los tiempos 2, 6, 24 y 12 horas (menor a mayor expresión de los genes) en el tratamiento Control, y no así en ASA100 en todos los tiempos, Polat y Emre (2006) demostraron que la administración de ASA en ligadura del conducto biliar de ratas disminuye la expresión de *SOD*, García-Triana *et al.* (2010) también mencionan una subexpresión de *SOD* bajo condiciones de 6 horas hipoxia en hepatopáncreas de camarón respecto a una normoxia y reoxigenación. La expresión de los genes de *COX* estuvo sobre expresada solamente al inicio del experimento en el tratamiento con ASA, lo que puede indicar que el ASA inhibió la enzima COX en los demás tiempos de administración de la dosis. Algo parecido encontraron Tian *et al.* (2017) en hepatopáncreas de una *carpa* (*Ctenopharyngodon idellus*) alimentada con un alimento con ARA + ASA, la COX-1 no tuvo respuesta en la expresión del gen, pero sí observaron la sobre expresión de COX-2 en hepatopáncreas y que pudo deberse a un mecanismo compensatorio con el objetivo de cumplir con los requerimientos de su PG en respuesta al inhibidor de COX. Todo parece indicar que el ASA en sí mismo puede ser un factor de estrés para los organismos, que sí bien, tal vez no se muestre un efecto a nivel de tejido, a nivel de expresión de genes sí hay una respuesta ante el uso del fármaco.

Este es el primer trabajo donde se busca establecer una dosis de ASA que logre la inhibición de las PG en camarones. Se concluye que una dosis de ASA100 ó ASA200 es suficiente para inhibir la producción de PG después de una hora de haber alimentado a los camarones, sin daño aparente sobre el tejido para los tiempos analizados. Entonces, se recomienda su uso para disminuir los efectos del estrés por manipulación.

8.3 Evaluación del efecto de un inhibidor de ciclooxigenasas sobre la producción de prostaglandinas y la supervivencia en camarones sometidos a estrés por manipulación y exposición aérea.

En el presente bioensayo, se encontró que el estrés redujo la supervivencia de los camarones (88%, Tabla XXV), un resultado similar a los obtenidos para *P. monodon* después de 1 hora de desecación (Duan *et al.*, 2016b). Sin embargo, cuando los camarones estresados recibieron ASA a través del alimento una hora antes del estrés, todos los camarones sobrevivieron (100%). Este resultado es interesante ya que asocia ASA, un inhibidor de la COX que reduce la secreción de PG, a la supervivencia durante el estrés por exposición aérea. Esto se corrobora aún más por los niveles de PG en branquias de camarones estresados en comparación con valores de PG significativamente más bajos en branquias de camarones estresados alimentados con ASA. Más aún, la mortalidad como resultado del estrés a corto plazo podría reducirse simplemente agregando ASA al alimento antes de someter a los organismos a una condición de estrés.

En el presente bioensayo, la exposición aérea a corto plazo (agudo) (15 minutos) fue suficiente para producir un abdomen blanquecino en varios camarones (8 camarones del tratamiento control y 11 del tratamiento con ASA), y en el grupo de control el 88.8 % sobrevivieron. Sin embargo, los mismos camarones alimentados con ASA y estresados lograron sobrevivir, a pesar de presentar abdomen blanco. El PCA muestra que la PG en las branquias está más asociada a una necrosis en camarones estresados. Esto en sí, representa un resultado de interés para la acuicultura, dado que es posible limitar los efectos nocivos del estrés administrando ASA en el alimento, lo cual podría disminuir la mortalidad por manipulación durante las siembras, biometrías, cosechas, en los cultivos de camarón en las granjas acuícolas.

Uno de los efectos que se quería evaluar con el presente bioensayo, era el efecto de un estrés agudo por manipulación en camarones sobre la producción de PGEM en branquias. No todos los tipos de estrés producen PG, y las PG no se secretan en todos los tejidos ante un estrés. El estrés aplicado, que consiste en atrapar el camarón, exponerlo al aire y re-sumergirlo en agua, puede reducir significativamente la supervivencia, particularmente en camarones que se consideran de menor calidad (Álvarez *et al.*, 2004). La exposición al aire afecta a los camarones al reducir su capacidad osmorregulatoria, como se observó en camarones expuestos al aire entre 14 y 21 minutos, en comparación

con camarones expuestos durante 7 minutos (Sang y Fodetar, 2007). En el presente trabajo se observó que los camarones sometidos a un estrés por manejo agudo y por exposición aérea, y resurgidos en agua tuvieron niveles mayores de PGEM en branquias que los camarones no estresados, que solo fueron estresados por la captura y manipulación, sin exposición al aire. La PGE₂ desempeña una función fundamental en el equilibrio de sales y agua y en el mantenimiento del flujo sanguíneo medular en mamíferos (Neuhofer *et al.*, 2007) y son una de las primeras moléculas en secretarse durante la fase inicial de la inflamación, dado que son esenciales para el control del flujo sanguíneo y la dilatación de los vasos necesarios para que los leucocitos experimenten una adhesión firme y diapédesis (Serhan y Savill, 2005). La PGE₂ tiene un mecanismo citoprotector, como se ha observado que evita la necrosis en la mucosa gástrica de mamíferos producida por un factor estresante químico o térmico agudo (Auguste *et al.*, 1988). Sin embargo, cuando el estímulo estresor se prolonga, la síntesis de PG también continúa y a la larga, puede producir tumorigénesis, carcinomas y otras patologías (Surh *et al.*, 2011; Tootle, 2013) y, finalmente, promover la muerte (Lee y Edwards, 2001; Penzo *et al.*, 2004; Miller, 2006). Este efecto de la PGE₂ se produce por silenciamiento de ciertos genes supresores de tumores y reparadores de DNA, a través de la metilación del ADN; este efecto puede ser inhibido por el ASA (Xia *et al.*, 2012). El ASA bloquea el sitio activo de la COX, evitando que el ARA se transforme en PG, como pudo verse por la reducción de PGEM en camarones estresados alimentados con ASA. Sin embargo, la COX puede continuar produciendo lípidos bioactivos, entre ellos resolvinas utilizando 22:6n-3 ó PGE₃ a través del EPA (20:5n-3) que es usando como sustrato (Serhan *et al.*, 2002), dado que el sitio activo para 22:6n-3 y 20:5n-3 es externo, mientras que para ARA es interno (Figura 8); el ASA estimula la síntesis de resolvinas cuando inhibe la síntesis de PG a partir de ARA. Estas resolvinas actúan de forma diferente a las PG₂, que se consideran estimuladores de la reproducción y del sistema inmune y de las PG₃ producidas por EPA y que se consideran tienen efectos contrarios a las PG₂, dado que son anti-inflmatorias en su mayoría. Las resolvinas se consideran protectoras, ya que pueden inhibir la expresión de citoquinas y reducir la inflamación y la peritonitis en humanos (Spite *et al.*, 2009). Los peces también pueden sintetizar lípidos bioactivos a partir de 22:6n-3 y 20:5n-3 (Coffa y Barash, 2004; Hong *et al.*, 2005). Esta puede ser la razón por

la cual el 22:6n-3 y 20:5n-3 estuvieron inversamente asociados a los niveles de PGE₂ y positivamente asociados a la supervivencia en el PCA. Es importante señalar que en el análisis de la PGEM se incluyen diversos tipos de PGE₂, y si se midieran las resolvinas o las PGE₃, posiblemente se encontrarían en considerables cantidades. Este resultado es interesante, porque podría explicar los efectos positivos de dietas altas en 22:6n-3 y 20:5n-3 durante el estrés, sin recurrir a la formación del sistema nervioso, por un lado, o la competencia por sitios activos de COX.

La autooxidación de PUFA da como resultado la formación de lípidos muy bioactivos que se generan por mecanismos enzimáticos *in vivo*, aunque sin la preferencia química. Con cada doble enlace adicional en un PUFA, el número de isómeros de hidroperóxidos generados por la autooxidación incrementa en dos unidades. Sin embargo, no todos los posibles isómeros de hidroperóxido se producen en la misma cantidad a partir de un determinado PUFA (Maddipati y Zhou, 2011). Aquí, la administración de ASA fue oral pero el efecto sobre la producción de PGEM fue el esperado en las branquias (las branquias son el primer órgano más expuesto y la primera barrera del camarón con el medio acuático, y el efecto del estrés se esperaba en este tejido). En un experimento en ratones, se observó que el efecto citoprotector de ASA en el tracto digestivo ocurría en menos de un minuto si el ASA se administraban oralmente, pero 15-30 min después de una inyección (Robert, 1979). Esto concuerda con los resultados aquí presentados, donde la administración fue oral, pero el efecto se observó en branquias 45 min después (15 min de exposición al aire y 30 de reinmersión). Durante la reinmersión de los camarones se restablece la disponibilidad de oxígeno, ocurriendo una mayor y rápida reperusión del oxígeno hacia los tejidos, produciendo un mayor incremento de ROS (García-Triana *et al.*, 2010), además de que el camarón incrementa su metabolismo para oxidar el lactato producido durante la exposición aérea (Zenteno-Savín *et al.*, 2006), que para el camarón equivale a una desecación y falta de O₂ disponible, por lo que hay una importante acumulación de CO₂, debido a la limitación del intercambio gaseoso y poría llevar a una acidosis. La generación de ROS es importante porque la producción de ciertas PG también es posible por medios no enzimáticos (Montine *et al.*, 2004; Roberts y Fessel, 2004; Davis

et al., 2006). Los ROS producen peroxidación lipídica, como se pudo observar para los camarones estresados, tanto en aquellos que recibieron el alimento control como el alimento con ASA. Curiosamente, la peroxidación también incrementó en camarones no estresados alimentados con ASA.

Otro efecto del ASA fue la disminución de los niveles de proteína en hepatopáncreas en camarones, aun sin estrés. Este efecto ya se había observado en mamíferos, donde el ASA y otros AINE inhiben la síntesis de proteínas, evitando así la apoptosis y otros efectos atribuibles a las PG (Grösch *et al.*, 2006). Otro de los efectos sobre el metabolismo es la regulación de la expresión del gen *GLUT4* por medio de PGE_2 , donde se ha reportado hasta 70% de reducción de los niveles de ARNm para este gen en humanos con niveles altos de ARA y de PG, disminuyendo de manera efectiva el transporte de glucosa a la célula (Long y Pekala, 1996). Aquí, se observó una disminución de glucosa por estrés con acumulación de lactato, pero no se observó un efecto significativo sobre la glucosa por el ASA.

Con el presente bioensayo, se propone que incluir ASA en el alimento a corto plazo y en concentraciones relativamente bajas puede disminuir la mortalidad post-estrés y limitar los efectos nocivos del estrés por manejo durante las siembras, biometrías, etc. Esto en sí, representa un resultado de interés para la acuicultura, y sería interesante evaluar las PG por separado y otros efectos fisiológicos, como la HSP.

9. CONCLUSIONES

1. Los camarones que crecieron más durante el bioensayo de crecimiento, no fueron necesariamente más tolerantes al estrés agudo por manipulación y exposición aérea. El alimento con 10% de harina de calamar incrementó el consumo de alimento y el crecimiento de los camarones durante el bioensayo de crecimiento, pero el alimento con almeja resultó mejor para disminuir los efectos negativos del estrés agudo. Esto podría indicar que cada tipo de harina presenta componentes que son utilizables por el camarón para diferentes tipos de circunstancias y podría ser la base del uso de alimentos funcionales cuando se requieren diferentes respuestas por parte del camarón, como son mayor crecimiento o mejor tolerancia al estrés. Esto es muy interesante, ya que indica que los alimentos que promueven un mejor crecimiento no están correlacionados con una mayor supervivencia durante condiciones de estrés y deben tomarse en cuenta en la nutrición y el cultivo de camarón, ya que podrían ser benéficos particularmente durante las biometrías poblacionales, el control de la densidad, registro del crecimiento y rendimiento del cultivo durante la cosecha.
2. Este es el primer trabajo donde se establece el efecto inhibitorio de ASA sobre la producción de PG en camarones, las dosis y tiempos de respuesta. Se concluye que dosis de 100 ó 200 mg/kg en el alimento son suficientes para inhibir la producción de PG una hora después de haber alimentado a los camarones, sin que se observe daño aparente sobre el tejido, como fue el caso de ASA a 400 mg/kg.
3. El estrés por manipulación aumentó significativamente los niveles de PG en branquias; sin embargo, en camarones alimentados con ASA una hora antes, los niveles de PG disminuyeron respecto al tratamiento control favoreciendo el aumento de la supervivencia. Aún si estos resultados son muy interesantes y de aplicación en la acuicultura, el uso de ASA en los alimentos para camarón requiere de mayor estudio, debido a que no está claro su efecto sobre la condición fisiológica del camarón expuesto a este fármaco.

10. LITERATURA CITADA

- Aguilar, V., I. S. Racotta, E. Goytortúa, M. Wille, P. Sorgeloos, R. Civera, y E. Palacios. 2012. The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquac. Nut.* 18: 258-271.
- Ahmed, M., M. H. U. Biswas, M. M. Rahman, M. S. A. Bhuiyan, M. A. H. M. Kamal, y G. Sadik. 2001. Development of a spectrophotometric method for the determination of aspirin in blood sample. *The Sci.* 1: 61-62
- Alfaro-Montoya, J. 2015. The effect of ibuprofen on female and male reproduction of the open thelyca marine shrimp, *Litopenaeus*. *Aquac. Res.* 46: 105–116.
- Álvarez, A. L., I. S. Racotta, O. Arjona y E. Palacios. 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 237: 237-249.
- Álvarez, J. S., A. Hernández-Llamas, J. Galindo, I. Fraga, T. García y H. Villarreal. 2007. Substitution of fishmeal with soybean meal in practical diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante y Kensley 1997). *Aquac. Res.* 38: 689-695.
- Amaya, E. A., D. A., Davis y D. B. Rouse. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture* 262: 393-401.
- Ameziane-El-Hassani, R., C. Buffet, S. Leboulleux y C. Dupuy. 2019. Oxidative stress in thyroid carcinomas: Biological and clinical significance. *Endocr-Relat Cancer.* 1: R131-R143.
- Aparicio-Simón, B., M. Piñón, R. Racotta y I. S. Racotta. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture* 298: 308–314.
- Auguste, L. J., L. A. M. B. R. O. S. Angus, T. A. Stein y L. E. S. L. I. E. Wise. 1988. Starvation and mucosal prostaglandin-E₂ in gastric stress ulceration. *Crit. Care Med.* 16: 610-611.
- Barton, B. A. y G. K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis* 1: 3-26.
- Basri, N. A., S. R. M. Shaleh, P. Matanjun, N. M., Noor y R. Shapawi. 2015. The potential of microalgae meal as an ingredient in the diets of early juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. Appl. Phycol.* 27: 857-863.
- Basu, S. 2008. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Sign.* 10: 1405-1434.

- Bauer, W., C. Prentice-Hernandez, M. B. Tesser, W. Wasielesky Jr. y L. H. Poersch. 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 342: 112-116.
- Bell, M. V. y D. R. Tocher. 2009. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, New York, NY. 211-236 pp.
- Béné, C., M. Barange, R. Subasinghe, P. Pinstруп-Andersen, G. Merino, G. I Hemre y M. Williams. 2015. Feeding 9 billion by 2050—Putting fish back on the menu. *Food Sec.* 7: 261-274.
- Benzie, I. F. 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39: 53-61.
- Bowler, C., W. Van Camp, M. Van Montagu, D. Inze y K. Asada. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sc.* 13: 199-218.
- Bowyer, J. N., J. G. Qin y D. A. J. Stone. 2013. Protein, lipid and energy requirements of cultured marine fish in cold, temperate and warm water. *Rev. Aquacult.* 5: 10–32.
- Browdy, C., G. Seaborn, H. Atwood, D. A Davis, R. A. Bullis, T. M. Samocha y J. W. Leffler. 2006. Comparison of pond production efficiency, fatty acid profiles, and contaminants in *Litopenaeus vannamei* fed organic plant-based and fish-meal based diets. *J. World Aquacult. Soc.* 37: 437-451.
- Brzeska, M., K Szymczyk y A. Szterk. 2016. Current knowledge about oxysterols: a review. *J. food sci.* 81: R2299-R2308.
- Brzozowski, T., P. C. Konturek, S. J. Konturek, S. Kwiecień, Z. Sliwowski, R. Pajdo y E. G. Hahn. 2003. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *Int J Colorectal Dis.* 18: 320-329.
- Butterfield, D. A., y B. Halliwell. 2019. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 20: 148-160.
- Cabiscol Català, E., J. Tamarit Sumalla y J. Ros Salvador. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 2000: 3-8.
- Calder, P. C. 2005. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem Soc.* 33: 423-427.
- Cardenia, V., M. T. Rodriguez-Estrada, E. Boselli y G. Lercker. 2013. Cholesterol photosensitized oxidation in food and biological systems. *Biochimie.* 95: 473-481.
- Chandra, J., A. Samali y S. Orrenius. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Bio. Med.* 29: 323-333.
- Cheng, Z. J., K. C. Behnke, y W. G. Dominy. 2002. Effect of feather meal on growth and body composition of the juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. Appl.*

Aquac. 12: 57-69.

Cheng, Z.J. y R.W. Hardy. 2004. Protein and lipid sources affect cholesterol concentrations of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). J. Anim. Sci. 82: 1136–1145.

Chiang, N. y C. N. Serhan. 2004. Aspirin triggers formation of anti-inflammatory mediators: New mechanism for an old drug. Discov. Med.: 470-475.

Chien, Y. H., C. H. Pan y B. Hunter. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. Aquaculture 216: 177-191.

Choe, E. y D. B. Min. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. Compr. Rev. Food Sci. F. 8: 345-358

Chrousos, G. P. 2009. Stress and disorders of the stress system. Nat. Rev. Endocrinology. 5: 374.

Civera, R., y J. Guillaume. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. Aquac. 77: 145–156.

Civera-Cerecedo R., A. García-Reyes, E. Goytortua-Bores y S. De La Paz-Reyes. 2011. Partial and total replacement of fishmeal by Catarina scallop *Argopecten ventricosus* byproduct meal in practical diets for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture America 2011. Febrero 28 -marzo 3, 2011. New Orleans, LA, USA

Coffa, G. y A.R. Brash. 2004. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation. PNAS. 101: 1–6.

Corral-Rosales, D. C., D. Ricque-Marie, L. E. Cruz-Suárez, O. Arjona-López, C. Rodríguez-Jaramillo, C. Navarro y E. Palacios. 2020. Reduction of spermatophore melanization in *Litopenaeus vannamei* shrimp fed *Ulva clathrata* during a commercial hatchery production. Anim. Reprod. Sci. 217:106468.

Coutteau, P., M. R. Camara y P. Sorgeloos. 1996. The effect of different levels and sources of dietary phosphatidylcholine on the growth, survival, stress resistance, and fatty acid composition of postlarval *Penaeus vannamei*. Aquaculture 147: 261-273.

Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque y AQUACOP. 1992. Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juveniles reared in pond pens and tanks. Aquaculture 106, 293-299

Cruz-Suárez, L. E., M. Nieto-López, C. Guajardo-Barbosa, M. Tapia-Salazar, U. Scholz, y D. Ricque-Marie. 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. Aquaculture 272: 466-476.

D'Abramo, L. R., C. E. Bordner, D. E. Conklin. y N. A. Baum. 1981. Essentiality of dietary phosphatidylcholine for the survival of juvenile lobsters. J. Nut. 111: 425-431.

- Dandapat, J., G. B. Chainy y K. J. Rao. 2000. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Phys. C.* 127: 101-115.
- Darachai, J., S. Piyatiratitivorakul, P. Kittakoop, C. Nitithamyong y P. Menasveta. 1998. Effects of Astaxanthin on larval growth and survival for the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. The 5th Asian Fisheries Forum, Book of Abstracts, Fisheries and Food Security Beyond the year 2000, Thailand, 174p.
- Davis, D. A. y C. R. Arnold. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 185: 291-298.
- Davis, D. A., A. L. Lawrence y D. M. Gatlin III. 1993. Response of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium: phosphorus ratio. *J. World Aquacult. Soc.* 24:504-515.
- Davis, T. A., L. Gao, H. Yin, J. D. Morrow y N. A. Porter. 2006. In vivo and in vitro lipid peroxidation of arachidonate esters: The effect of fish oil ω 3 lipids on product distribution. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 14897–14904.
- Dimitrovska, M., M. Dervisevik, N. Cipanovska, K. Gerazova, S. Dinevska-Kjovkarovska y B. Miova. 2018. Physiological and pharmacological inductors of HSP70 enhance the antioxidative defense mechanisms of the liver and pancreas in diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharm.* 96: 158-164.
- Dinh, T., y L. Thompson. 2016. Cholesterol: Properties, Processing Effects, and Determination. En: Caballero, P., M. Finglas y F. B. T. E. de y H. Toldrá (Eds.) Oxford: Academic Press. 60-69p.
- Duan, Y., J. Zhang, H. Dong, Y. Wang, Q. Liu, y H. Li. 2016a. Effect of desiccation and resubmersion on the oxidative stress response of the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immun.* 49: 91–99.
- Duan, Y., Y. Zhang, H. Dong y J. Zhang. 2016b. Effect of desiccation on oxidative stress and antioxidant response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immun.* 58:10-17.
- Eades, C. y C. P. Waring. 2010. The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Environ. Res.* 69: S46-S48.
- Eissa, N. y H. P. Wang. 2016. Transcriptional stress responses to environmental and husbandry stressors in aquaculture species. *Aquaculture* 8: 61-88.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. 243pp.

- Fitzgerald, D. J. y G. A. FitzGerald. 2013. Historical lessons in translational medicine: cyclooxygenase inhibition and P2Y₁₂ antagonism. *Circ. Res.* 112: 174-194.
- Fotedar, S. y L. Evans. 2011. Health management during handling and live transport of crustaceans: a review. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 143-152.
- Francis, G., H. P Makkar y K. Becker. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199: 197-227
- Freas, W. y S. Grollman. 1980. Ionic and osmotic influence on prostaglandin release from the gill tissue of a marine bivalve, *Modiolus demissus*. *J. Exp. Biol.* 84: 169-185.
- Funk, C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-1875.
- Galano, J. M., J. C. Y. Lee, C. Gladine, B. Comte, J. Y. Le Guennec, C. Oger y T. Durand. 2015. Non-enzymatic cyclic oxygenated metabolites of adrenic, docosahexaenoic, eicosapentaenoic and α -linolenic acids; bioactivities and potential use as biomarkers. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* L. 1851: 446-455.
- Gao, W., B. Tan, K. Mai, S. Chi, H. Liu, X. Dong y Q. Yang. 2012. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to long-term low salinity stress. *Aquaculture* 364: 186-191.
- Garcia-Cruset, S., K. L. Carpenter, R. Codony y F. Guardiola. 2002. Cholesterol oxidation products and atherosclerosis. En *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products*. AOCS Publishing. 245-281 pp.
- García-Triana, A., Zenteno-Savín, T., Peregrino-Uriarte, A.B. y Yepiz-Plascencia, G. 2010. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: Effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Develop. Comp. Immunol.* 34: 1230-1235.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman y S. A. Ben-Sasson. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501.
- Glaeser, J. y G. Klug. 2005. Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology* 151: 1927-1938
- Glencross, B., S. IrvinArnold, S., D. Blyth, N. Bourne y N. Preston. 2014. Effective use of microbial biomass products to facilitate the complete replacement of fishery resources in diets for the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 431: 12-19.
- Gong, H., A. L. Lawrence, D. H Jiang, F. L Castille y D. M. Gatlin. 2000. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. *Aquaculture* 90: 305-324.
- González-Félix, M. L. y M. Perez-Velazquez. 2002. Current Status of Lipid Nutrition of

Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suarez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Corte's, N. Simoes (eds.), Avances en Nutricion Acuicola VI. Memorias del VI Simposium International de Nutriocion Acuicola, Cancun, Quitana Roo, México.36-45pp.

González-Félix, M. L., A. L. Lawrence, D. M., Gatlin y M. Perez-Velazquez. 2003. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. *Aquac. Nutr.* 9: 105–113.

Grösch, S., T. J. Maier, S. Schiffmann y G. Geisslinger, 2006. Cyclooxygenase-2 (COX-2)–independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.* 98: 736-747.

Guan, L. y J. G. Scandalios. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *PNAS.* 92: 5930-5934.

Guardiola, F. 2002. Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects. Ed. The American Oil Chemists Society. 384pp.

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

Halliwell, B. 2011. Free radicals and antioxidants—*quo vadis?* *Trends Neurosci.* 32: 125-130.

Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1996. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford. 188–266pp.

Hassan, A. M. 2003. Glutathione peroxidase activity in blood cells from aspirin-induced asthma patients. *Ann. Clin. Biochem.* 40: 369-373.

Hawkey, C. J. 1999. COX-2 inhibitors. *Lancet.* 353: 307-314.

Heckmann, L. H., A. Callaghan, H. L. Hooper, R. Connon, T. H. Hutchinson, S. J. Maund y R. M. Sibly. 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology lett.* 172: 137-145.

Hernández, C., M. A., Olvera-Novoa, K. Aguilar-Vejar, B. González-Rodríguez y I. A. De la Parra. 2008. Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 277: 244-250

Hernández-Becerra, J. A. H., A. A. O Flores, G. Valerio-Alfaro, I. Soto-Rodriguez, M. T Rodríguez-Estrada y H. S. García. 2014. Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage. *Food Chem.* 145: 832-839.

Higuchi, Y. 2003. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1527-1535.

- Hong, S., E. Tjonahen, E. L. Morgan, Y. Lu, C. N. Serhan y A.F., Rowley. 2005. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins — Mediator lipidomic analysis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 78: 107–116
- Huang, J. H., S. G. Jiang, H. Z. Lin, F. L. Zhou y L. Ye. 2008. Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquac. Res.* 39: 240-251.
- Hunt, J. N. y D. R. Franz. 1981. Effect of prostaglandin E₂ on gastric mucosal bleeding caused by aspirin. *Digest. Dis. Sci.* 26: 301-305.
- Jomova, K., M. Lawson y M. Valko. 2013. Mechanisms of antioxidant activity. In *Food Oxidants and Antioxidants* CRC Press. 342-359 pp.
- Kaulmann, A., M. C. Jonville, Y. J. Schneider, L. Hoffmann y T. Bohn. 2014. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chem.* 155: 240-250.
- Kitabayashi, K., K. Shudo, K. Nakamura y S. Ishikawa. 1971. Studies on formula feed for Kuruma prawn. On the growth promoting effects of both arginine and methionine. *Bull. Japan Soci. Sci. Fish.* 65: 119-127.
- Knight, J., A. F. Rowley, M. Yamazaki y A. S. Clare. 2000. Eicosanoids are modulators of larval settlement in the barnacle, *Balanus amphitrite*. *J. Mar. Biolog. Assoc.* 80: 113-117.
- Kulig, W., L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, T. Rog y I. Vattulainen. 2016. Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chem. Phys. Lipids.* 199: 144-160.
- Kunkel, S. L., M. Spengler, M. A. May, R. Spengler, J. Larrick y D. Remick. 1988. Prostaglandin E₂ regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *Int. J. Biol. Chem.* 263: 5380-5384
- Lee, C.H. y A.M., Edwards. 2001. Stimulation of DNA synthesis by tumor promoters in primary rat hepatocytes is not mediated by arachidonic acid metabolites. *J. Cell. Physiol.* 187: 336–344.
- Li, Y., L. Wei, J. Cao, L. Qiu, X. Jiang, P. Li y X. Diao. 2016. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere.* 144: 234-240.
- Licona, J. B. A. 2015. Respuesta al estrés y calidad bioquímica post-mortem del camarón en relación a la inclusión de subproductos pesqueros en el alimento. Tesis (Maestro en Ciencias). La Paz, BCS. CIBNOR. 100 pp.
- Lightner, D. V. 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge (La.): World Aquaculture Society.

- Liu, H. L., S. P. Yang, C. G. Wang, S. M. Chan, W. X. Wang, Z.H. Feng y C. B. Sun. 2014. Effect of air exposure and resubmersion on the behavior and oxidative stress of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. N. Am. J. Aquacult. 77: 43–49.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25: 402-408.
- Long, S.D. y P.H. Pekala. 1996. GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. Biochem. J. 184: 179–184.
- Lordan, S., J. J. Mackrill y N. M. O'Brien. 2009. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. J. Nutr. Biochem. 20: 321-336.
- Lupatsch, I., L. Cuthbertson, S. Davies y R. J. Shields. 2008. Studies on energy and protein requirements to improve feed management of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Management. 281-295.
- Maddipati, K. R. y S. L. Zhou. 2011. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 94: 59-72.
- Malcorps, W., B. Kok, M. van't Land, M. Fritz, D. van Doren, K. Servin, y M. J. Santos. 2019. The sustainability conundrum of fishmeal substitution by plant ingredients in shrimp feeds. Sustainability 11: 1212.
- Marklund, S. L., N. G. Westman, E. Lundgren y G. Roos. 1982. Copper-and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. Cancer Res. 42: 1955-1961.
- Mendez, L., E. Palacios, B. Acosta, P. Monsalvo-Spencer y T. Alvarez-Castañeda. 2006. Heavy metals in the clam *Megapitaria squalida* collected from wild and phosphorite mine-impacted sites in Baja California, Mexico. Biol. Trace Elem. Res. 110: 275.
- Mendoza, R., J. Montemayor y J. Verde. 1997. Biogenic amines and pheromones as feed attractants for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquac. Nut. 3: 167-173.
- Merchie, G., E. Kontara, P. Lavens, R. Robles, K. Kurmaly y P. Sorgeloos. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquac. Res. 29: 579-585.
- Mercier, L., E. Palacios, Á. I. Campa-Córdova, D. Tovar-Rámirez, R. Hernández-Herrera y I. S. Racotta. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture 258: 633-640.
- Miller, S.B. 2006. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. Semin. Arthritis Rheum. 36: 37–49.
- Milne, G. L., Q. Dai y L. J. Roberts II. 2015. The isoprostanes—25 years later. Bba-Mol Cell Biol. L. 1851: 433-445.

- Montine, K.S., J. F. Quinn, J. Zhang, J.P. Fessel, L.J. Roberts, J. D. Morrow, T. J. Montine. 2004. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids*. 128: 117–124.
- Morales-Bojórquez, E., M. A. Cisneros-Mata, M. O. Nevárez-Martínez y A. Hernández-Herrera. 2001. Review of stock assessment and fishery biology of *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. *Fish. Res.* 54: 83-94.
- Mori, T. A., D. W. Dunstan, V. Burke Croft, K. D. Rivera, J. H. Beilin y I. B. Puddey. 1999. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non—insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 48: 1402-1408.
- Mutti, D. W., E. L. Ballester, R. C. Martino, W. Wasielesky y R. O. Cavalli. 2017. Feeding n-3 HUFA enriched *Artemia* to the larvae of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* increases stress tolerance and subsequent growth. *Lat. Am. J. Aquat Res.* 45: 18-24.
- Navarro C., A. Beltran-Lugo, R. Civera, I.S. Racotta y E. Palacios. 2013. Optimizing n–3 HUFA levels in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using “finishing diets”. Poster session presented at: Aquaculture. (Feb 21–25; Nashville, Tennessee).
- Neil, D. M. 2012. Ensuring crustacean product quality in the post-harvest phase. *J. Invertebr. Pathol.* 110: 267-275.
- Neuhofer, W., D. Steinert, M. L. Fraek y F. X. Beck. 2007. Prostaglandin E₂ stimulates expression of osmoprotective genes in MDCK cells and promotes survival under hypertonic conditions. *J. Physiol.* 583: 287-297.
- Ngo, D. H., I. Wijesekara, T. S. Vo, Q. Van Ta y S. K. Kim. 2011. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Res. Int.* 44: 523-529.
- Niu, J., H. Wen, C. H. Li, Y. J. Liu, L. X. Tian, X. Chen, Z. Huang, H. Z. Lin. 2014. Comparison effect of dietary astaxanthin and β -carotene in the presence and absence of cholesterol supplementation on growth performance, antioxidant capacity and gene expression of *Penaeus monodon* under normoxia and hypoxia condition. *Aquaculture* 422: 8-17.
- Norambuena, F., M. Lewis, N. K. Hamid, A. Hermon, K. J. A Donald y G. M. Turchini. 2013. Fish oil replacement in current aquaculture feed: is cholesterol a hidden treasure for fish nutrition? *PloS one* 8: e81705p.
- Nunes, A. J., H. Sabry-Neto, S. Oliveira-Neto y L. Burri. 2019. Feed preference and growth response of juvenile *Litopenaeus vannamei* to supplementation of marine chemoattractants in a fishmeal-challenged diet. *J. World Aquacult. Soc.* 50: 1048-1063.
- Nunes, A. J., M. V. Sá, F. F., Andriola-Neto y D. Lemos. 2006. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 260: 244-254.
- Nunes, B., J. C. Campos, R. Gomes, M. R. Braga, A. S. Ramos, S. C. Antunes y A. T.

- Correia. 2015. Ecotoxicological effects of salicylic acid in the freshwater fish *Salmo trutta fario*: antioxidant mechanisms and histological alterations. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 667-678.
- Obaldo, L. G., S. Divakaran y A. G. Tacon. 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. *Aquac. Res.* 33: 369-377.
- Olsen, R. L. y M. R. Hasan. 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends Food Sci Tech.* 27: 120-128.
- Orlando, B. J., M. J. Lucido y M. G. Malkowski. 2015. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *J. Struct. Biol.* 189: 62-66.
- Osada, K., T. Kodama, L. Cui, K. Yamada, y M. Sugano. 1993. Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1893-1898
- Osada, M. y T. Nomura. 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Prostaglandins* 40: 229-239.
- Otaegui-Arrazola, A., M. Menendez-Carreño, D. Ansorena y I. Astiasarán. 2010. Oxysterols: a world to explore. *Food Chem. Toxicol.* 48: 3289-3303.
- Palacios, E., C. I. Perez-Rostro, J. L. Ramirez, A. M. Ibarra y I. S. Racotta. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture* 171: 309-321.
- Palacios, E., I. S. Racotta, E. Kraffe, Y. Marty, J. Moal y J. F. Samain. 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture* 250: 270-282.
- Palacios, E., I. S. Racotta, H. Heras, Y. Marty, J. Moal, J. F. Samain. 2001. The relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquac. Int.* 9: 531-543.
- Palacios, E., I. S. Racotta, O. Arjona, Y. Marty, J. R. Le Coz, J. Moal y J. F. Samain. 2007. Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis: 2. Lipid classes and sterols. *Aquaculture.* 266: 266-273
- Park, J. Y., M. H. Pillinger y S. B. Abramson. 2006. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: The role of PGE₂ synthases. *J. Clin. Immunol.* 119: 229-240.
- Parrilla-Taylor, D. P. y T. Zenteno-Savín. 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture* 318: 379-383.
- Patnaik, S., T. M. Samocha, D. A. Davis., R. A Bullis y C. L. Browdy. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nut.* 12: 395-401.
- Patrignani, P. y C. Patrono. 2015. Cyclooxygenase inhibitors: from pharmacology to clinical read-outs. *BBA-Mol Cell Biol L.* 1851: 422-432.

- Pedersen, A. K. y G. A. FitzGerald. 1984. Dose-related kinetics of aspirin: presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N. Engl. J. Med.* 311: 1206-1211.
- Phillips, K. L., P. D. Nichols y G. D. Jackson. 2003. Dietary variation of the squid *Moroteuthis ingens* at four sites in the Southern Ocean: stomach contents, lipid and fatty acid profiles. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 83: 523-534.
- Phillips, K. L., P. D. Nichols. y G. D. Jackson. 2002. Lipid and fatty acid composition of the mantle and digestive gland of four Southern Ocean squid species: implications for food-web studies. *Antarct. Sci* 14: 212-220.
- Piedade, F., S. Bio y B. Nunes. 2020. Effects of common pharmaceutical drugs (paracetamol and acetylsalicylic acid) short term exposure on biomarkers of the mussel *Mytilus spp.* *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 73: 103276.
- Polat, A. y M. H. Emre. 2006. Effects of melatonin or acetylsalicylic acid on gastric oxidative stress after bile duct ligation in rats. *J. Gastroenterol.* 41: 433.
- Poleksic, V. y V. Mitrovic-Tutundzic. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller R, Lloyd R (Eds.) *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish.* Fishing News Books, Oxford
- Poorani, R., A. N. Bhatt, B. S. Dwarakanath y U. N. Das. 2016. COX-2, aspirin and metabolism of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their physiological and clinical significance. *Eur. J. Pharmacol.* 785: 116-132.
- Prameswari, K., M., Hemalatha, B., Kishori y P. S. Reddy. 2017. Role of Arachidonic Acid and COX Inhibitors in the Regulation of Reproduction in Freshwater Crab *Oziotelphusa senex senex*. *J. Aquac. Res. Dev.* 8: 490.
- Qian, Z., X. Liu, L. Wang, X. Wang, Y. Li, J. Xiang y P. Wang. 2012. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Phys C.* 156: 211-220.
- Quintana-López, A., M. A. Hurtado-Oliva, M. Manzano-Sarabia, D. J. López-Peraza, C. Hernández, A. García y E. Palacios. 2019. Effect of rearing conditions on astaxanthin accumulation in the white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 47: 303-309.
- Racotta, I. S. y R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 125: 437-443.
- Raes, H., B. P. Braeckman, G. R. Criel, U. Rzeznik y J. R. Vanfleteren. 2000. Copper induces apoptosis in *Aedes C6/36* cells. *J. Exp. Zool. Part A.* 286: 1-12.
- Reddy, P. R., G. P. C. Nagaraju y P. S. Reddy. 2004. Involvement of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex*. *J. Crustacean Biol.* 24: 511-515.

- Regunathan, C. y S. G. Wesley. 2006. Pigment deficiency correction in shrimp broodstock using *Spirulina* as a carotenoid source. *Aquaculture Nutrition*, 12: 425-432.
- Rigdon, R. H. y K. N. Baxter. 1970. Spontaneous necroses in muscles of brown shrimp, *Penaeus aztecus* Ives. *T. Am. Fish Soc.* 99: 583-587.
- Robert, A. 1979. Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology* 77: 761-767.
- Roberts, L.J. y J. P. Fessel. 2004. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*. 128: 173-186
- Robles-Romo, A., O. Arjona y I. S. Racotta. 2014. Influence of sampling, storage, processing and optimal experimental conditions on adenylate energy charge in penaeid shrimp. *Arch. Biol.* 66: 651-666.
- Robles-Romo, A., T. Zenteno-Savín y I. S. Racotta. 2016. Bioenergetic status and oxidative stress during escape response until exhaustion in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Bio. Eco.* 478: 16-23.
- Rodríguez-Jaramillo, M. C. 2014 Cambios fisiológicos durante la gametogénesis en respuesta a incremento de temperatura experimental y natural: Comparación entre una especie de ostión templada (*Crassostrea gigas*) y una tropical (*C. corteziensis*). Tesis (Doctor en Ciencias Marinas y Costeras. B.C.S., México. Universidad Autónoma de B.C.S. 229p.
- Rose-Sallin, C., A. C. Huggett, J. O. BossetTabacchi y L. B. Fay. 1995. Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [2H7] cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *J. Agric. Food Chem.* 43: 935-941.
- Roth, G. J., N. Stanford y P. W. Majerus. 1975. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *PNAS.* 72: 3073-3076.
- Rowley, A. F., C. L. Vogan, G. W. Taylor y A. S. Clare. 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. *J. Exp. Biol.* 208: 3-14.
- Rozen, S., y H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols* Humana Press, Totowa, NJ. 365-386 pp.
- Sabry-Neto, H., D. Lemos, T. Raggi y A. J. P. Nunes. 2017. Effects of soy protein ratio, lipid content and minimum level of krill meal in plant-based diets over the growth and digestibility of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nut.* 23: 293-303.
- Saito, H. y K. Ishihara. 1997. Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1531-1536.
- Saito, H., M. Sakai y T. Wakabayashi. 2014. Characteristics of the lipid and fatty acid compositions of the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*: The trophic relationship between the squid and its prey. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 16: 360-366.

- Samocha, T. M., D. A. Davis, I.P. Saoud y K. DeBault. 2004. Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 231: 197-203.
- Sang, H. M. y R. Fotedar. 2005. The effects of air exposure on hemolymph osmoregulatory capacity of brown tiger shrimp, *Penaeus esculentus*, and western king shrimp, *Penaeus latisulcatus*, reared at different salinities. *J Appl Aquaculture*. 16: 79-94.
- Sargent, J.R., D.R. Tocher, y J.G. Bell. 2002. The lipids. En: Halver, J.E., y Hardy, R.W. (Eds), *Fish Nutrition*, 3rd ed. New York, Elsevier Science. 181–257p.
- Schmitt, A. C. y E. A. Santos. 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. *Comp Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 106: 329-336.
- Schmitz, G. G., T. Walter, R. Seibl y C. Kessler. 1991. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 192: 222-231.
- Schreck, C. B. y L. Tort. 2016. The concept of stress in fish. *Fish Physiology*. 35: 1-34. Academic Press.
- Schroepfer, Jr., G. J. 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80: 361-554.
- Schrör, K. y M. Voelker. 2016. NSAIDS and Aspirin: Recent Advances and Implications for Clinical Management. En *NSAIDs and Aspirin* Springer, Cham. 107-122 pp.
- Serhan, C. N. y J. Savill. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6: 1191-1197.
- Serhan, C. N. y N. Chiang. 2004. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entree for resolomics. *Rheumatic Rheum. Dis. Clin. N. Am.* 30: 69-95.
- Serhan, C.N., S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, R. Moussignac. 2002. Resolvins: A Family of Bioactive Products of Omega-3 Fatty Acid Transformation Circuits Initiated by Aspirin Treatment that Counter Proinflammation Signals. *J. Exp. Med.* 196.
- Shi, J., M. Fu, C. Zhao, F. Zhou, Q. Yang y L. Qiu. 2016. Characterization and function analysis of Hsp60 and Hsp10 under different acute stresses in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Cell Stress Chaperon.* 21: 295-312.
- Song, M. K. y N. F. Adham. 1978. Role of prostaglandin E₂ in zinc absorption in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 234: E99.
- Soto-Rodríguez, I., P. J. Campillo-Velázquez, J. Ortega-Martínez, M. Rodríguez-Estrada, G. Lercker y H. S. García. 2008. Cholesterol oxidation in traditional Mexican dried and deep-fried food products. *J. Food Compos. Anal.* 21: 489-495

- Spite, M., L. Norling, L. Summers, R. Yang, D. Cooper, N. A. Petasis, R. J. Flower, M. Perretti y C. N. Serhan- 2009. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 461: 1287–1291.
- Stanley, D. W. y J. S. Miller. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119: 1-13.
- Stubhaug, I., O. Lie y B.E Torstensen. 2006. β -oxidation capacity in tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) during smoltification, fed either 100% capelin oil or 100% vegetable oil blend. *J. Fish Biol.* 69: 504–517.
- Sudaryono, A., M. J. Hoxey, S. G. Kailis y L. H. Evans. 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 134: 313-323.
- Sumpownon, C., A. Engsusophon, T. Siangcham, E., Sugiyama, N. Soonklang, P. Meeratana, Ch. Wanichanon, J. Hanna, M. Setou y P. Sobhon. 2015. Variation of prostaglandin E₂ concentrations in ovaries and its effects on ovarian maturation and oocyte proliferation in the giant fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Gen Comp Endocr.* 223: 129-138.
- Sun, S., F. H. Xuan, J. Fu, X. Ge Zhu y Z. Gu. 2015. Transcriptomic and histological analysis of hepatopancreas, muscle and gill tissues of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in response to chronic hypoxia. *BMC genomics.* 16: 491.
- Surh, I., J. Rundhaug, A. Pavone, C. Mikulec, E. Abel y S.M. Fischer. 2011. Upregulation of the EP1 receptor for prostaglandin E₂ promotes skin tumor progression. *Mol. Carcinogen.* 50: 458–468.
- Tacon A.J, y M. Metian. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285:146–58.
- Tadasi, N. y O. Hiroshi. 1976. Distribution of prostaglandins in the animal kingdom. *B. B. A. Lipids Lipid Metab.* 431: 127-131.
- Tahara, D. y I. Yano. 2004. Maturation-related variations in prostaglandin and fatty acid content of ovary in the kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Comp Biochem Phys A* 137: 631-637.
- Takama, K., T. Suzuki, K. Yoshida, H. Arai y T. Mitsui. 1999. Phosphatidylcholine levels and their fatty acid compositions in teleost tissues and squid muscle. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 124: 109-116.
- Tan, B., K. Mai, S. Zheng, Q. Zhou, L. Liu y Y. Yu. 2005. Replacement of fish meal by meat and bone meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquac. Res.* 36, 439-444.
- Tan, R. K. H., y W. G. Dominy. 1997. Commercial pelleting of crustacean feeds. *Crustacean Nutrition. J World Aquac Soc.* 6: 520-549.

- Tantikitti, C. 2014. Feed palatability and the alternative protein sources in shrimp feed. *SJST*. 36: 51-55.
- Tapiero, H., G. N. Ba, P. Couvreur y K. D. Tew. 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother*. 56: 215-222.
- Terrazas-Fierro, M., R. Civera-Cerecedo, L. Ibarra-Martínez, E. Goytortúa-Bores, M. Herrera-Andrade y A. Reyes-Becerra. 2010. Apparent digestibility of dry matter, protein, and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 308: 166–173.
- Thebault, M. T. y J. P. Raffin. 1991. Seasonal variations in *Palaemon serratus* abdominal muscle metabolism and performance during exercise, as studied by ³¹P NMR. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 74:175-183.
- Thongrod, S., A. Tansutapanich y O. J. Torrissen. 1995. Effect of dietary astaxanthin supplementation on accumulation, survival and growth in postlarvae of *Penaeus monodon* Fabricius. *Larvi* 95: 251-254.
- Tian, J. J., C. X. Lei, H. Ji y A. Jin. 2017. Role of cyclooxygenase-mediated metabolites in lipid metabolism and expression of some immune-related genes in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed arachidonic acid. *Fish Physiol*. 43: 703-717.
- Tocher, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev Fish Sci*. 11: 107-184.
- Tocher, D. R., E. Å. Bendiksen, P. J. Campbell y J. G. Bell. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* 280: 21-34.
- Tootle, T. L. 2013. Genetic insights into the *in vivo* functions of prostaglandin signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 45: 1629-1632.
- Torres-Cuevas, I., A. Parra-Llorca, A. Sánchez-Illana, A. Nuñez-Ramiro, J. Kuligowski, C. Cháfer-Pericás, M. Cernada, J. Escobar y M. Vento. 2017. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox biol*. 12: 674-681.
- Toyes-Vargas, E., A. Robles-Romo, L. Méndez, E. Palacios y R. Civera. 2016. Changes in fatty acids, sterols, pigments, lipid classes, and heavy metals of cooked or dried meals, compared to fresh marine by-products. *Anim. Feed Sci. Tech*. 221: 195–205.
- Toyes-Vargas, E., A., M. Calderón-de la Barca, Y. Duran-Encinas, E. Palacios y R. Civera-Cerecedo, 2017. Marine co-product meals as a substitute of fishmeal in diets for white shrimp *Litopenaeus vannamei* improve growth, feed intake and muscle HUFA composition. *Aquac. Res*. 48: 3782-3800.
- Trasviña-Arenas, C. H., A. Garcia-Triana, A. B. Peregrino-Uriarte y G. Yepiz-Plascencia. 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. 164: 44-52.

- Ueno, Y., N. Miyamoto, K. Yamashiro, R. Tanaka y N. Hattori. 2019. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Stroke Burden. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 5549.
- Van Anholt, R. D., T. Spanings, W. Koven y S. E. W. Bonga. 2003. Effects of acetylsalicylic acid treatment on thyroid hormones, prolactins, and the stress response of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Am. J. Physiol-Reg I.* 285: R1098-R1106.
- Van Anholt, R. D., W. M., Koven, S. Lutzky y S. W. Bonga. 2004. Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 238: 369-383.
- Vane, J. R. y R. M. Botting. 2003. The mechanism of action of aspirin. *Thromb. Res.* 110: 255-258.
- Varvas, K., R. Koljak, I. Järving, T. Pehk y N. Samel. 1994. Endoperoxide pathway in prostaglandin biosynthesis in the soft coral *Gersemia fruticosa*. *Tetrahedron Lett.* 35: 8267-8270.
- Varvas, K., R. Kurg, K. Hansen, R. Järving, I. Järving, K. Valmsen y N. Samel. 2009. Direct evidence of the cyclooxygenase pathway of prostaglandin synthesis in arthropods: genetic and biochemical characterization of two crustacean cyclooxygenases. *Insect Biochem. Molec.* 39: 851-860.
- Vite-García, N., O. Arjona, E. Morales-Bojórquez, M. Mascaro, N. Simoes y E. Palacios. 2014. Assessment of lipid classes and fatty acid levels in wild newborn seahorses (*Hippocampus erectus*) (Perry 1810): implications for survival and growth in aquarium culture. *Mar. Freshw. Behav. Phy.* 47: 401-413.
- Wang, P., J. Wang, Y. Su, Z. Liu y Y. Mao. 2020. Air Exposure Affects Physiological Responses, Innate Immunity, Apoptosis and DNA Methylation of Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Front Physiol.* 11: 223.
- Wang, W. N., J. Zhou, P. Wang, T. T. Tian, Y. Zheng, Y. Liu y A. L. Wang. 2009. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comp. Biochem. Phys. C.* 150: 428-435.
- Wimuttisuk, W., P. Tobwor, P. Deenarn, K. Danwisetkanjana, D. Pinkaew, K. Kirtikara y V. Vichai. 2013. Insights into the prostanoid pathway in the ovary development of the penaeid shrimp *Penaeus monodon*. *PloS one*, 8: e76934.
- Wohlfeil, E. R. y W. B. Campbell. 1997. 25-Hydroxycholesterol enhances eicosanoid production in cultured bovine coronary artery endothelial cells by increasing prostaglandin G/H synthase-2. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid. Metab.* 1345: 109-120.
- Wu, J. P., H. C. Chen y D. J. Huang. 2009. Histopathological alterations in gills of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) after acute exposure to cadmium and zinc. *B. Environ. Contam. Tox.* 82: 90.
- Xia, D., D. Wang, S.H. Kim, H. Katoh, R.N. Dubois. 2012. Prostaglandin E₂ promotes

intestinal tumor growth via DNA methylation. *Nat. Med.* 18: 224–226

Xu, Z., R J. M. Egenstein, D. Xie, W. Lu, X. Ren, J. Yuan y L. Mao. 2018. The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. *Fish Shellfish Immun.* 72: 564-571.

Xu, Z., W. D. Guan, W. Xie, Lu, X. Ren, J. Yuan y L. Mao. 2019. Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. *Dev Comp Immunol.* 100: 103413.

Ye, W. J., D. K. Li, F. D. Y. Z. Sun y X. H. Liu. 2011. Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry by-product meal, blood meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein levels. *Aquac. Nut.* 17: e337-e347.

Yeh, S.T., Y.C. Lin, C. L. Huang y J. C. Chen. 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. *Fish Shellfish Immun.* 28: 887–894.

Yepiz-Plascencia, G., F. Vargas-Albores e I. Higuera-Ciajara. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* 191: 177-189.

Zamora-Méndez, S., A. Robles-Romo, E. Marin-Peralta, O. Arjona, J.P. Apún-Molina, A.I. Beltrán-Lugo, E. Palacios y I.S. Racotta. 2017. Postmortem metabolic, physicochemical, and lipid composition changes in *Litopenaeus vannamei* in response to harvest procedures. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 26: 1093-1106.

Zapata, M., F. Rodríguez y J. L. Garrido. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195: 29-45.

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

Zhou, J., L. Wang, Y. Xin, W. N. Wang, W. Y. He, A. L. Wang y Y. Liu. 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Therm. Biol.* 35: 284-289.

11. ANEXOS

11.1 Preliminares en el análisis de PGEM

11.1.1 *Pruebas de detección de PGEM usando distintos métodos de procesamiento en camarón.*

Se realizaron tres formas de procesamiento de tejidos, para evaluar si había pérdida de PGEM a causa del manejo de tejidos.

1. Método directo: para la purificación de la muestra, de cada camarón se tomó una porción de músculo, se congeló en nitrógeno líquido, se sacó con unas pinzas, se separó el exoesqueleto, sobre una placa de hielo, se cortó en trocitos, se agregó inmediatamente un volumen 4x de acetona helada y se incubó a -20°C por 30 minutos en un congelador (Torrey®).
2. Método politrón: se tomó un segundo trozo de músculo, se colocó en un tubo con un volumen 4x de solución Hank, se homogenizó en politrón por 10 segundos, se agregó un volumen 4x de acetona helada y se incubó a -20°C por 30 minutos en un congelador (Torrey®).
3. Método criogénico: se tomó un tercer trozo de músculo y se siguió el mismo proceso de traslado y disección de los procesos anteriores. Una vez sin exoesqueleto, se puso dentro de un cilindro de acero inoxidable (previamente congelado en nitrógeno líquido) y se homogenizó en un homogenizador criogénico por 1 min. El polvo resultante se colocó en otro tubo, se agregó un volumen 4x de acetona helada y se incubó a -20°C por 30 minutos en un congelador (Torrey®).

11.1.2 *Pruebas de detección de PGEM usando distintas cantidades de tejidos.*

Se usaron dos porciones distintas de músculo para cada tratamiento: 0.5 g y 3 g, usando los métodos descritos arriba.

11.1.3 *Pruebas de detección de PGEM en distintos tejidos.*

Todo el proceso de purificación (directo en acetona, homogenizado en politrón y homogenizado en criogénico) mencionados en el párrafo anterior se repitió para 0.3 g de músculo, 0.3 g de hepatopáncreas congelados en nitrógeno líquido y para 0.1 g de

branquias. Una vez listas todas las muestras se centrifugaron a 400g por 5 minutos, el sobrenadante resultante se pasó a tubos de 10 ml de vidrio, se secó en nitrógeno gaseoso y cada muestra fue re-suspendida en el volumen original de buffer ELISA. Las muestras listas se derivatizaron o guardaron a -80°C (hasta por un mes). Todo el protocolo de ensayo se siguió según lo descrito por el manual del kit de metabolito PGEM (Cayman Chemical Company, ítem N° 514531). Cada tejido se analizó por duplicado.

Resultados

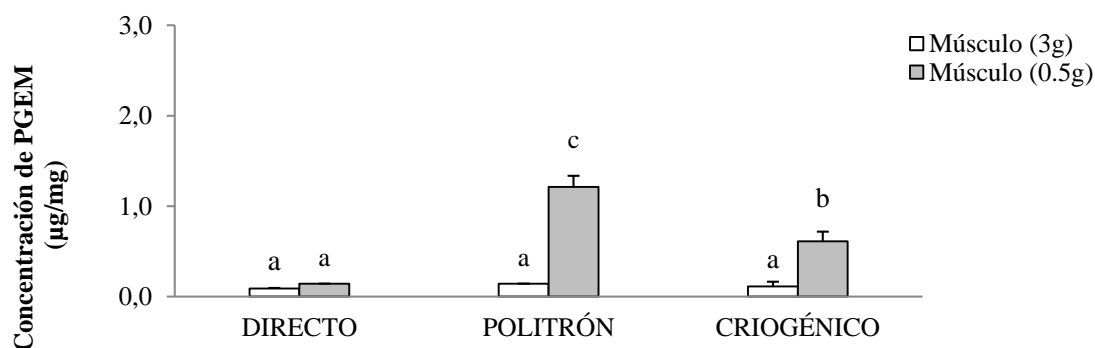


Figura 43. Concentración de PGEM en músculo de camarón en pruebas preliminares de detección de PGEM. Medias \pm desviación estándar, letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

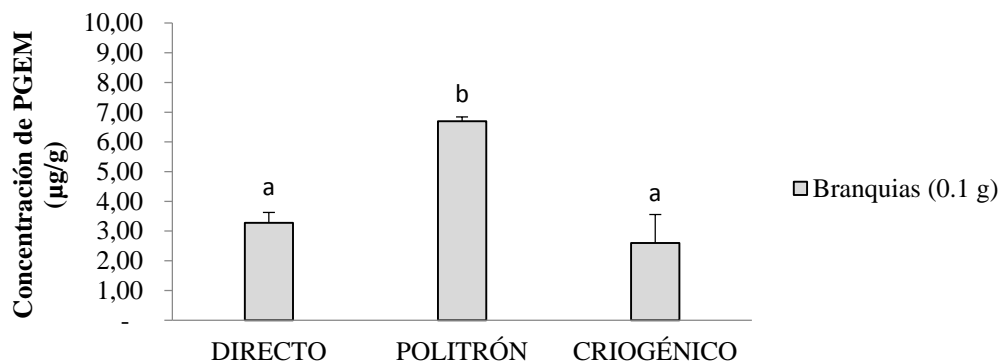


Figura 44. Concentración de PGEM en branquias de camarón en pruebas preliminares de detección de PGEM. Medias \pm desviación estándar, letras sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

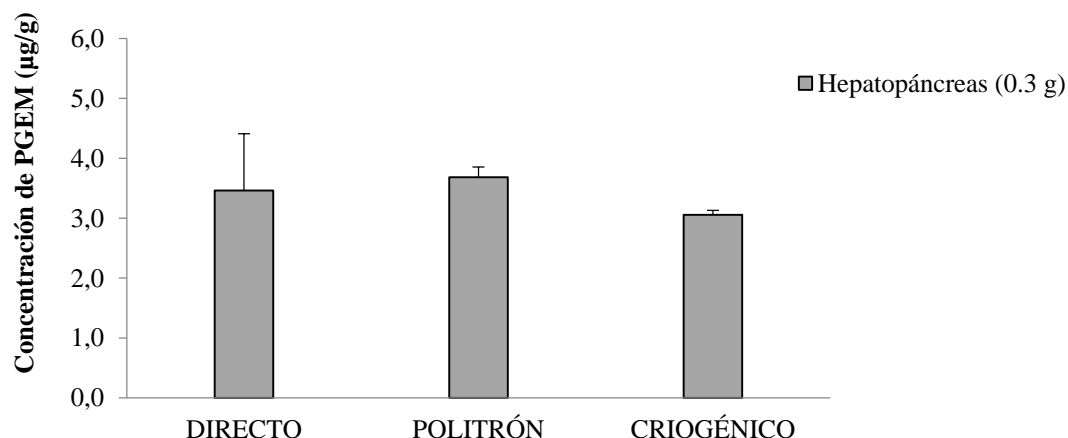


Figura 45. Concentración de PGEM en hepatopáncreas de camarón en pruebas preliminares de detección de PGEM. Medias \pm desviación estándar ($P>0.05$).

El método de homogenización que dio mejor señal de PGEM fue el realizado con politrón. Las branquias presentaron una señal intensa con 0.5 g de tejido. El músculo con 3 g, se saturó. Por lo tanto, el método de politrón puede ser usado para la determinación de PGE₂ por medio del kit ELISA, y por la intensidad de la señal pueden ser los tejidos de músculo y branquias.

11.2 Determinación de PGEM con ASA suministrado en agua

Para evaluar el efecto de ASA disuelto en agua, se realizó un bioensayo de aplicación de ASA en agua. Para esto se tomaron de referencia el alimento Control, y la dosis de ASA200. Se sembraron 48 juveniles de camarón blanco *L. vannamei* con peso promedio de 7.9 ± 0.05 g en 6 acuarios de 60 litros conteniendo 4 camarones por acuario (3 réplicas), se mantuvieron constantes los parámetros fisicoquímicos (temperatura de 27°C, salinidad 39 UPS y oxígeno disuelto superior a 5 mg/L). Al día siguiente, a los camarones del tratamiento Control se les dio la primera ración de alimento, la dosis de ASA200 contenía 200 mg/g (0.0064g) que fue diluida en el agua de cada acuario; transcurrida una hora, se capturaron y eutanasiaron, en nitrógeno líquido, 2 camarones de cada acuario hasta

completar todos los organismos de los tratamientos, y se guardaron a -80°C hasta sus análisis.

Resultados

No se detectaron diferencias significativas de PGEM en las branquias de los camarones Control y ASA200 (Figura 46).

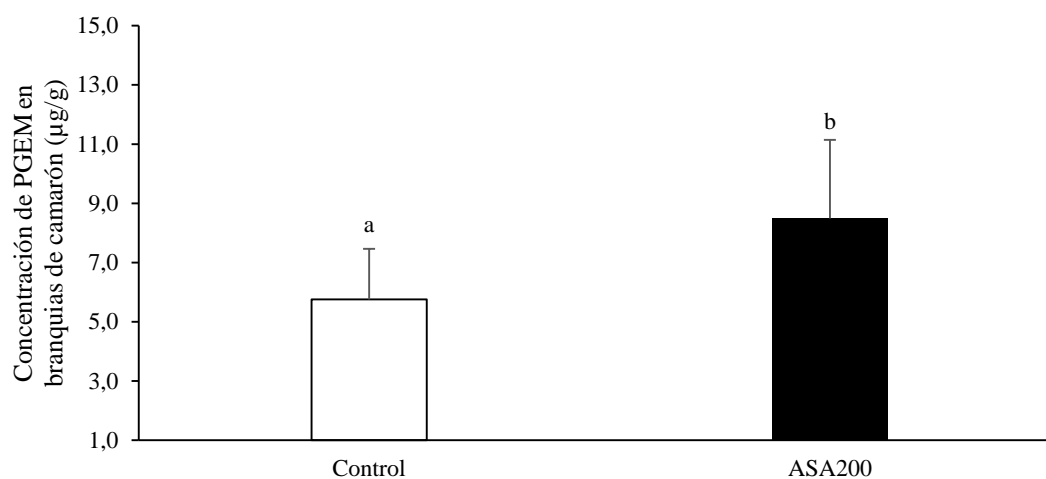


Figura 46. Concentración de PGEM ($\mu\text{g/g}$) en branquias de camarón expuestos a alimentos control y ASA200 en agua. Medias \pm error estándar. Letras sobre las barras indican diferencias significativas. ANOVA unifactorial ($P > 0.05$).

11.3 Determinación de ácido acetilsalicílico (ASA) en hemolinfa de camarón.

Método tomado y adaptado de Ahmed *et al.* (2001).

En un matraz volumétrico de 250 ml, se mezclaron el reactivo A y B como lo indica Ahmed *et al.* (2001), y aforaron a 250 ml con agua destilada. Se pasó el contenido a un frasco de vidrio ámbar de 250 ml, homogenizaron y reservaron hasta su uso.

Reactivo férrico-mercúrico

- 1 Se disolvió 10 g de HgCl_2 en un volumen pequeño de agua destilada (20 ml aproximadamente) y se reservó (Reactivo A).

- 2 Se disolvió 10 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en 30 ml de HCl 1N y se reservó (Reactivo B).

Estándar de ácido acetilsalicílico

1. Se disolvió ~ 0.1 g de ácido acetilsalicílico en 1 ml de agua destilada.
2. Se calentó en baño María a ~65°C para su completa disolución.

De esta solución stock se prepararon por diluciones los estándares de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL.

Nota: Opcionalmente puede hacer diluciones seriadas de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 y 0 µg/mL.

Curva estándar para ácido acetilsalicílico

1. Se preparó un baño María a 45 ± 2 °C.
2. Se colocaron en tubos de ensayo 1 ml de cada estándar y a un tubo se colocó de igual modo agua destilada (blanco).
3. Se calentaron los tubos durante 3 – 5 min en baño María a 45°C y se enfriaron en el chorro de agua atemperada.
4. Se adicionaron 5 ml de la mezcla Fe-Hg y se mezcló por agitación hasta su homogenización.
5. Se calentaron durante 2 - 5 minutos en baño María a 45°C y se enfriaron en el chorro de agua atemperada.
6. Se tomó 1.5 ml de la solución y se analizó en espectrofotómetro a $\lambda 540$ nm.

Análisis de las muestras

1. En tubos de ensayo, se colocó 1 ml de la muestra a analizar.
2. Se adicionó 5 ml de la mezcla Fe-Hg y se mezcló por agitación hasta su homogenización.
3. Se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min.
4. Se tomó 1.5 ml del sobrenadante teniendo cuidado de no desprender la pastilla y se analizó en espectrofotómetro a $\lambda 540$ nm.

Resultados

1. Se graficaron los valores de las absorbancias vs la concentración para obtener una línea recta, la cual representa los puntos de la curva de calibración.
2. Con la pendiente de la curva, se sustituyen los valores de absorbancia de las lecturas problema para encontrar la concentración de ácido acetilsalicílico en la muestra de hemolinfa de camarón.

Absorbancia en las muestras de hemolinfa de camarón.

El análisis se realizó modificando la técnica para adaptarla a micro-placa, para adaptarlas a 500 μl de hemolinfa.

La técnica, originalmente emplea 1 ml de muestra y 5 ml del reactivo Fe-Hg, por tal razón se adaptó la técnica para emplear un mínimo de 40 μl de muestra de hemolinfa de camarón y 200 μl del reactivo Fe-Hg (relación 5:1).

Desarrollo

1. Se descongeló sobre baño de hielo y homogenizaron las muestras a analizar.
2. Se tomaron 40 μl de la muestra de hemolinfa de camarón y se colocaron en un tubo Ependorf de 600 μl .
3. Se adicionaron 200 μl del reactivo Fe-Hg y se homogenizaron por agitación severa empleando un vortex.
4. Los tubos se centrifugaron a 4500 rmp durante 5 minutos.
5. Se obtienen 200 μl del sobrenadante cuidando de no desprender la pastilla y se colocaron en una microplaca.
6. Se analizaron en espectrofotómetro a $\lambda 540 \text{ nm}$.

Resultado

Para obtener las concentraciones de ASA en las muestras, se realizó una curva estándar de ASA.

1. Se pesaron aproximadamente 0.1 g de ASA y se disolvieron en 1 ml de agua. Para su completa disolución se sometió el tubo a calentamiento apoyándose de un baño María.
2. De esta solución stock se realizaron diluciones para obtener los estándares de concentraciones equivalentes a 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL. O bien, diluciones seriadas de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 y 0 µg/mL.
3. En tubos Ependorf de 600 µl, se colocaron 40 µl de cada uno de los estándares (a un tubo se agregan 40 µl de agua; blanco de reacción) y se incubaron a 45° C por 2 – 5 minutos en baño María. Enfriarlos en chorro de agua atemperada.
4. Se adicionar a cada uno de los tubos 200 µl del reactivo Fe-Hg y calentar a 45° C por 2 – 5 minutos en baño María. Enfriarlos en chorro de agua atemperada.
5. Se tomaron 200 µl de la solución y se colocaron en los pozos de una microplaca.
6. Se analizaron en espectrofotómetro a λ 540 nm.
7. Se realizó el análisis de regresión lineal para obtener la pendiente de la curva, el origen y el coeficiente de regresión R².
8. Se hicieron los cálculos para obtener las concentraciones de ASA en las muestras.
 $[\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}] = (\text{absorbancia de la muestra}/\text{pendiente de la curva}) - (\text{intercepción de la curva})$.

11.4 Concentración de esteroides y ácidos grasos de los alimentos del Objetivo 1

Tabla XXX. Esteroides totales (concentración del total de esteroides) en los alimentos experimentales.

| Esteroides | Control | Catarina | Calamar | <i>P</i> |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|----------|
| Concentración (mg/100g) | | | | |
| Dihidrocolesterol | 7.6 ± 4.3 | 8.2 ± 1.6 | 4.7 ± 1.0 | NS |
| Colesterol | 50.3 ± 9.9 | 56.4 ± 12.8 | 38.1 ± 1.5 | NS |
| Brassicasterol | 0.7 ± 0.2 ^a | 0.5 ± 0.2 ^{ab} | 1.1 ± 0.2 ^c | * |
| Campesterol | 0.5 ± 0.1 ^a | 0.5 ± 0.2 ^a | 0.9 ± 0.0 ^b | * |
| Estigmasterol | 0.2 ± 0.1 | 0.2 ± 0.0 | 0.2 ± 0.1 | NS |
| β-sitosterol | 2.6 ± 0.1 | 2.5 ± 0.2 | 2.5 ± 0.3 | NS |

Tabla XXXI. Concentración de ácidos grasos totales (mg/100g en peso húmedo) en los alimentos experimentales usados en el bioensayo de crecimiento. Medias \pm error estándar, Superíndices sobre las medias indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

| | Control | Catarina | Calamar | P |
|---------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|
| 14:0 | 73.9 \pm 1.5 ^a | 103.0 \pm 7.0 ^b | 73.8 \pm 4.9 ^a | * |
| 16:0 | 517.6 \pm 9.8 | 542.3 \pm 22.1 | 494.1 \pm 31.9 | NS |
| 18:0 | 144.5 \pm 2.6 | 149.5 \pm 6.3 | 131.5 \pm 7.6 | NS |
| 16:1n-7 | 121.1 \pm 2.2 | 129.4 \pm 7.4 | 119.0 \pm 7.1 | NS |
| 18:1n-9 | 564.1 \pm 13.7 ^b | 452.4 \pm 19.3 ^a | 518.0 \pm 26.7 ^{ab} | * |
| 18:1n-7 | 93.1 \pm 1.6 | 81.0 \pm 4.2 | 84.1 \pm 4.6 | NS |
| 20:1n-9 | 93.2 \pm 2.3 ^b | 53.1 \pm 2.4 ^a | 49.0 \pm 1.4 ^a | * |
| 18:2n-6 | 778.0 \pm 15.6 ^b | 580.9 \pm 44.0 ^a | 703.8 \pm 49.5 ^{ab} | * |
| 18:3n-3 | 126.3 \pm 2.4 ^b | 90.4 \pm 7.9 ^a | 109.7 \pm 6.9 ^{ab} | * |
| 20:4n-6 | 41.5 \pm 0.4 ^c | 20.5 \pm 1.9 ^a | 32.0 \pm 2.3 ^b | * |
| 20:5n-3 | 274.4 \pm 3.3 ^b | 148.1 \pm 17.3 ^a | 264.8 \pm 18.3 ^b | * |
| 22:6n-3 | 449.0 \pm 9.2 ^b | 214.2 \pm 26.4 ^a | 409.6 \pm 33.0 ^b | * |
| Σ SAT | 783.9 \pm 14.5 | 846.6 \pm 37.5 | 739.0 \pm 47.1 | NS |
| Σ MUFA | 1021.1 \pm 24.1 | 905.0 \pm 48.3 | 897.9 \pm 50.7 | NS |
| Σ PUFA | 1803.6 \pm 32.4 ^b | 1145.1 \pm 107.3 ^a | 1640.9 \pm 117.6 ^b | * |
| Σ HUFA | 861.4 \pm 14.2 ^b | 442.2 \pm 52.6 ^a | 798.3 \pm 59.6 ^b | * |
| n-3/n-6 | 1.05 \pm 0.01 ^b | 0.79 \pm 0.03 ^a | 1.10 \pm 0.01 ^b | * |