



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**RELACIÓN ENTRE RESPUESTAS FISIOLÓGICAS,
CONTENIDO BIOQUÍMICO Y EXPRESIÓN DEL CAMARÓN
BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) ANTE CAMBIOS
AGUDOS Y CRÓNICOS DE HIPERTERMIA E HIPOXIA**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

SERGIO ALAN ULAJE FERNÁNDEZ

La Paz, Baja California Sur, Enero de 2015.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 horas del día 12 del Mes de Diciembre del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Relación entre respuestas fisiológicas, contenido bioquímico y expresión del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia”


Presentada por el alumno:

Sergio Alan Ulaje Fernández


Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUICULTURA.

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

LA COMISION REVISORA


Dra. María Teresa Sicard González
Directora


Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-tutor


Dr. Pedro Cruz Hernández
Co-tutor


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Directora

Dra. María Teresa Sicard González
CIBNOR, La Paz, B. C. S.

Co-tutores:

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
CIBNOR, La Paz, B. C. S.

Dr. Pedro Cruz Hernández
CIBNOR, La Paz, B. C. S.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. María Teresa Sicard González
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Pedro Cruz Hernández

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. María Teresa Sicard González
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle (Suplente)

RESUMEN

El presente trabajo juveniles de 11 g de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) fueron expuestos ante cambios agudos (2 h) y crónicos (28 días) de hipertermia (34°C) e hipoxia (2mgO₂/L), similares a las que ocurren en cultivos reales bajo condiciones extremas. Se estudiaron las respuestas fisiológicas a través de la estimación del potencial de crecimiento (PC) y las tasas implicadas para su cálculo: de ingestión (TI), respiratoria (TR), de excreción de amonio (TE) y eficiencia de absorción (EA). El contenido bioquímico fue analizado por métodos tradicionales y estandarizados en músculo (MUS), hepatopáncreas (HP), hemolinfa (HM) y branquia (BRA). También se evaluó la expresión de rutas metabólicas por el método de microarreglos y finalmente se buscaron relaciones entre estas respuestas. Durante el reto agudo de hipertermia los organismos disminuyeron su TI, sin otros cambios, pero durante la recuperación se observó una reducción de la TE acompañado de un incremento en el PC. Durante el reto agudo de hipoxia, los organismos redujeron su TI y TR, pero se recuperaron a las 24 h, mientras se observó un incremento de la TE a este tiempo. También se observó la reducción de hemocianina. La EA y el PC no se modificaron. En la respuesta crónica, se observó una compensación total de la TI, pero la EA disminuyó con el tiempo, mientras que la TE bajó. La TR y el PC oscilaron de acuerdo a los cambios térmicos; además la concentración de hemocianina se incrementó para sostener la demanda de oxígeno en el organismo debido al estrés. En el contenido bioquímico, durante todos los retos se observó que los organismos disminuyen su contenido de proteínas (PT) y glucógeno (GCG) (por su uso como energía), mientras aumentan su reservas de lípidos (LIP) en HP; y además, aumentaron los carbohidratos (CHO) en MUS y BRA para actuar de reserva energética en respuesta posterior al estrés, pues se observó durante ambos retos agudos recuperación hasta valores iniciales pasadas 24 h de finalizar el evento estresante. Aparte de lo anterior, en el reto crónico también se observó que los organismos aumentaron su contenido de triglicéridos y carotenoides en HP y de GCG y LIP en MUS para almacenar energía en ambos tejidos y reparar el probable estrés oxidativo en HP por la exposición prolongada. En cuanto a las respuestas de expresión, se observó que durante el reto térmico agudo los organismos buscan mediante la sobreexpresión de rutas como la glucólisis y unión de nucleótidos, subsanar vías afectadas de reparación (organización de membrana, organización de cromosomas, respuesta inmune) y uso de energía (peptidasas), que causaron daños estructurales. En el reto agudo de hipoxia los organismos mostraron la represión de rutas de desorganización estructural y las PT y ácidos grasos jugaron un papel importante en la reparación. Por otro lado, los organismos compensaron el estrés a largo plazo usando vías de obtención de energía, a partir de PT y cofactores como estrategias alternativas. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que las respuestas fisiológicas, de contenido bioquímico y de expresión se relacionan entre si, formando una respuesta integral principalmente a nivel energético. Los resultados obtenidos son la base para seleccionar genes, compuestos bioquímicos y tasas fisiológicas, que estén involucrados en la respuesta tanto de hipoxia como de hipertermia, para ser usados como indicadores de estrés, debido a su relación e importancia.

ABSTRACT

The aim of this study is to describe the responses of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles (11 g) to acute (2 h) and chronic (28 days) changes of hyperthermia (34 °C) and hypoxia (2 mgO₂/L), similar to those occurring in a typical shrimp farm. The ingestion (TI), absorption (TA) respiratory (TR) and excretion (TE) rates, and the absorption efficiency (EA), were estimated to determine the energetic balance of the organisms and to obtain the scope for growth (PC). The biochemical composition was analyzed by traditional methods already standardized for shrimp muscle (MUS), hepatopancreas (HP), haemolymph (HM) and gills (BRA). The transcript changes in different metabolic pathways were evaluated in the gills using a heterologous microarray designed for *C. elegans*. The relationship between those physiological, biochemical and molecular responses were analyzed and described in this work. The only physiological response for acute hyperthermia is a decrease in the TI, but during the recovery time at 24 h we observed a reduction of the TE and an increase in the PC. Hemocyanin showed no changes by hyperthermia. During acute hypoxia, juvenile shrimps reduced their TI and TR, but they recover after 24 h, whereas a constant increase of the TE along the experiment was observed. The EA and PC are unchanged, and the acute hypoxia triggers a reduction of hemocyanin due to the lack of oxygen. In the chronic response, a total compensation of IT was observed, the EA and TE decreased over time. PC and TR changed in a direct relation to temperature changes; the hemocyanin concentration increased over time in this challenge in order to sustain the oxygen demand of the body. In all the experiments the organisms reduce their content of protein and glycogen (presumably used as energy sources), while the lipid reserves increase in HP; furthermore, there was a marked hyperglycemia in MUS and BRA, likely acting as an energetic reserve to recovery from stress, because we observed that in the acute challenges, the carbohydrate content in these tissues returned to its initial values 24 h after recovering from stress. In the chronic response we also observed an increase in the triglyceride and carotenoid concentration in HP and in glycogen and lipids in MUS, most likely to store energy in both tissues and repair oxidative stress in HP due to chronic exposure. In the transcript response for acute hyperthermia, we observed activation in the glycolysis and nucleotide binding pathways, presumably as a repair response in order to reduce the damage induced by the repression in pathways like membrane organization, chromosomal organization and immune response, that caused a structural damage. We found that in organisms exposed to acute hypoxia, the metabolic pathways of structural disorganization were repressed, while the pathways of proteins and fatty acids likely played a role in repairing the stress. We conclude that the organisms compensate the chronic stress by activating pathways that ensured the production of energy, using proteins and cofactors as energy source. According to the results described we concluded that the physiological, biochemical and molecular responses are related at energetic level and can be applied in the selection of genes, biochemical compounds and physiological rates to provide the basis for selecting molecules that can be used as indicators of stress, and that are of special value since they are related to each other.

DEDICATORIA

*Viendo fijo hacia el firmamento,
Observé que algo te escondía;
Dude estar en el camino correcto,
Al ver lejos, tu luz y compañía.*

*Ahora leer me dio el conocimiento,
Para aceptar día con día;
Que solo el tiempo da eso,
A lo que llamamos...
Sabiduría.*

***Esta tesis esta dedicada para aquellos que desde el primer día de mi vida me
han amado, acompañado y enseñado a vivir:***

Mamá, Papá y Hermana

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por el soporte recibido para la realización de este trabajo y la colaboración de su calificado personal que me brindó apoyo tanto científico, como educativo y social.

A CONACYT por la beca de Maestría otorgada con el número 1021310059, la cual permitió mi soporte durante mis cursos y la realización de este trabajo.

Al proyecto de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por el financiamiento del presente estudio mediante el proyecto “Aplicación de la genómica funcional como estrategia para la mejora continua el Camarón” (número 126427), módulo de Ecofisiología.

En particular y especialmente a mi directora de tesis la Dra. Ma. Teresa Sicard González por toda su paciencia, confianza, dirección y comentarios para la elaboración del presente documento.

A mis asesores y miembros de mi comité tutorial Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro y Dr. Pedro Cruz Hernández por el gran apoyo y asistencia en la culminación del trabajo presente.

Al personal técnico y amigos del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, M.C. Rosa Linda Salgado García, M.C. Gilberto González Soriano y al Ing. Julio Egrén Félix Domínguez por su invaluable colaboración para los montajes de sistemas, el entrenamiento técnico en el uso de los mismos y en el desarrollo experimental realizado.

Al M.C. Roberto Hernández Herrera, del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por su apoyo técnico en el procesamiento de muestras y compartir su experiencia en todas las técnicas bioquímicas usadas en esta aventura.

A la Dra. Liliana Rojo Arreola y M.C. Sara de las Heras por su siempre presente transmisión de conocimientos y alegría en cada una de las partes de los experimentos.

A mis compañeros de batalla Donaldo, Jorge y Samuel.

A mis padres, hermana, Perla, primos y gran familia de la cual formo parte.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
GLOSARIO	xvi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
Marco ambiental del camarón blanco	5
Potencial de crecimiento	5
Contenido bioquímico	7
Expresión	10
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
General	14
Específicos	14
METODOLOGÍA	15
DISEÑO EXPERIMENTAL	15
ORGANISMOS EXPERIMENTALES	15

Origen	15
Aclimatación	16
CONTROL DE VARIABLES AMBIENTALES	17
BIOENSAYOS	17
Exposición al reto agudo de temperatura	17
Exposición al reto agudo de oxígeno	18
Exposición al reto crónico combinado de temperatura y oxígeno	19
TEJIDOS	20
Muestreo	20
Preservación de muestras	21
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS	22
Sistema de incubación	22
Tasas Fisiológicas	23
<i>Tasa de Ingestión</i>	23
<i>Eficiencia de absorción</i>	24
<i>Tasa de absorción</i>	25
<i>Tasa respiratoria</i>	25
<i>Tasa de excreción de amonio</i>	26
Potencial de Crecimiento	26
Pigmento respiratorio (hemocianina)	27
CONTENIDO BIOQUÍMICO	27
Proteínas Totales	28
Carbohidratos Totales	29
Glucógeno	29

Glucosa	30
Lactato	31
Lípidos	32
Triglicéridos	32
Colesterol	33
Carotenoides	34
EXPRESIÓN	35
Extracción de ARN	35
Diseño experimental de microarreglos	36
Hibridación de microarreglo heterólogo	36
Análisis de microarreglos	38
Análisis de información	39
RESULTADOS	40
BIOENSAYOS	40
Exposición a cambio agudo de temperatura	40
Exposición a cambio agudo de oxígeno	40
Exposición a cambio crónico de temperatura y oxígeno	41
TEJIDOS OBTENIDOS	42
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS	43
Tasas Fisiológicas	43
<i>Tasa de ingestión</i>	43
<i>Tasa respiratoria</i>	45
<i>Tasa de excreción de amonio</i>	47
<i>Eficiencia de absorción</i>	49
Potencial de crecimiento	50

Pigmento respiratorio (hemocianina)	50
CONTENIDO BIOQUÍMICO	54
Proteínas	54
Carbohidratos	58
Glucógeno	62
Glucosa	65
Lactato	67
Lípidos	68
Triglicéridos	71
Colesterol	75
Carotenoides	79
EXPRESIÓN	83
Reto agudo de temperatura	84
Reto agudo de hipoxia	85
Reto crónico de temperatura	86
Reto crónico de hipoxia	87
DISCUSIÓN	88
RESPUESTAS FISIOLÓGICAS	88
CONTENIDO BIOQUÍMICO	91
EXPRESIÓN	98
RELACIÓN ENTRE RESPUESTAS	100
CONCLUSIONES	104
RECOMENDACIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	106

LISTA DE FIGURAS

	Descripción	Página
Figura 1	Patrones de variación diarios de oxígeno disuelto (línea sólida) y temperatura (línea punteada), registrados en estanques de cultivo de camarón durante los periodos de mayor mortalidad, en Sinaloa, Sonora y Nayarit. (Cortesía de G. Portillo y F. Magallón).	2
Figura 2	a) Proceso de extracción de organismos experimentales de la granja productora de reproductores Acuacultura Mahr, S.A. de C.V., b) detalle del tanque de traslado que muestra los aireadores y la malla colocada en el interior y c) proceso de extracción de los organismos del tanque posterior al traslado para su aclimatación.	16
Figura 3	Vista de los diferentes estadios de muda en camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) (Smith y Dall, 1985).	17
Figura 4	Diseño del cambio agudo de temperatura al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) de 11 g de peso.	18
Figura 5	Diseño del cambio agudo de oxígeno al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) de 11 g de peso.	19
Figura 6	Diseño de la oscilación térmica (rojo) y de oxígeno disuelto (azul) a la que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) de 11 g de peso, durante el reto crónico a 28 días.	20
Figura 7	Extracción de hemolinfa en camarones (fotografía tomada de Pascual <i>et al.</i> , 2003).	21
Figura 8	Sistema de incubación de cámaras para la determinación de tasas fisiológicas.	23
Figura 9	Diseño experimental utilizado para el análisis de expresión de cada reto con el microarreglo heterólogo de <i>Caenorhabditis elegans</i> . Los colores representan los marcadores usados en las muestras para contrastar el efecto por los retos.	36
Figura 10	Registro de temperatura al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) de 11 g de peso, durante el cambio agudo.	40
Figura 11	Registro de oxígeno disuelto al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) de 11 g de peso, durante el cambio agudo.	41
Figura 12	Registro de las oscilaciones térmicas y de oxígeno disuelto a las que fueron expuestos organismos juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) de 11 g de peso, para evaluar la respuesta crónica a 28 días.	42
Figura 13	Tasa de ingestión ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).	44
Figura 14	Tasa de ingestión ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).	45
Figura 15	Tasa de ingestión ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO ₂ /L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias	45

significativas (n=10).

- Figura 16 Tasa respiratoria ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 46
- Figura 17 Tasa respiratoria ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 46
- Figura 18 Tasa respiratoria ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 47
- Figura 19 Tasa de excreción ($\bar{x} \pm ds$), de amonio de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 48
- Figura 20 Tasa de excreción ($\bar{x} \pm ds$), de amonio de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 48
- Figura 21 Tasa de excreción ($\bar{x} \pm ds$), de amonio de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 48
- Figura 22 Eficiencia de absorción ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 49
- Figura 23 Eficiencia de absorción ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 49
- Figura 24 Eficiencia de absorción ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 50
- Figura 25 Potencial de crecimiento ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 51
- Figura 26 Potencial de crecimiento ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 51
- Figura 27 Potencial de crecimiento ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 52

Figura 28	Contenido de hemocianina ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).	52
Figura 29	Contenido de hemocianina ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).	53
Figura 30	Contenido de hemocianina ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).	53
Figura 31	Contenido de proteínas totales ($\bar{x} \pm ds$), en cuatro tejidos de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo	55
Figura 32	Contenido de proteínas totales ($\bar{x} \pm ds$), en cuatro tejidos de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo	56
Figura 33	Contenido de proteínas totales ($\bar{x} \pm ds$), en cuatro tejidos de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo	57
Figura 34	Contenido de carbohidratos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo	59
Figura 35	Contenido de carbohidratos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo	60
Figura 36	Contenido de carbohidratos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo	61
Figura 37	Contenido de glucógeno ($\bar{x} \pm ds$), en hepatopáncreas (HP) y músculo (MUS) de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).	62
Figura 38	Contenido de glucógeno ($\bar{x} \pm ds$), en hepatopáncreas (HP) y músculo (MUS) de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).	63

- Figura 39 Contenido de glucógeno ($\bar{x} \pm ds$), en hepatopáncreas (HP) y músculo (MUS) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 64
- Figura 40 Contenido de glucosa ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 65
- Figura 41 Contenido de glucosa ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C . Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 66
- Figura 42 Contenido de glucosa ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 66
- Figura 43 Contenido de lactato ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 67
- Figura 44 Contenido de lactato ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C . Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 68
- Figura 45 Contenido de lactato ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 68
- Figura 46 Contenido de lípidos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo 69
- Figura 47 Contenido de lípidos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C . Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo 70
- Figura 48 Contenido de lípidos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo 71
- Figura 49 Contenido de triglicéridos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo. 72

- Figura 50 Contenido de triglicéridos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo 73
- Figura 51 Contenido de triglicéridos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto crónico oscilando la temperatura 31 ± 3°C y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo 74
- Figura 52 Contenido de colesterol ($\bar{x} \pm ds$), en músculo (MUS) y hepatopáncreas (HP) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 76
- Figura 53 Contenido de colesterol ($\bar{x} \pm ds$), en músculo (MUS) y hepatopáncreas (HP) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 77
- Figura 54 Contenido de colesterol ($\bar{x} \pm ds$), en músculo (MUS) y hepatopáncreas (HP) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto crónico oscilando la temperatura 31 ± 3°C y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). 78
- Figura 55 Contenido de carotenoides ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo. 80
- Figura 56 Contenido de carotenoides ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo 81
- Figura 57 Contenido de carotenoides ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) durante el reto crónico oscilando la temperatura 31 ± 3°C y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo 82

LISTA DE TABLAS

	Descripción	Página
Tabla I	Resumen de muestras de tejido obtenidas para análisis bioquímicos procedentes de juveniles de camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) expuestos a diferentes condiciones de temperatura y oxígeno disuelto, tanto en retos agudos como crónicos.	43
Tabla II	Resultado de expresión los microarreglos heterólogos de branquia de juveniles de <i>L. vannamei</i> con genes de <i>C. elegans</i> .	83
Tabla III	Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de <i>L. vannamei</i> sometidos al reto agudo de temperatura a 34°C, manteniendo el oxígeno disuelto a saturación. La hibridación se realizó con <i>C. elegans</i> .	84
Tabla IV	Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de <i>L. vannamei</i> sometidos al reto agudo de hipoxia 2 mgO ₂ /L, manteniendo la temperatura a 28°C. La hibridación se realizó con <i>C. elegans</i> .	85
Tabla V	Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de <i>L. vannamei</i> sometidos al reto crónico de temperatura 31±3°C, el oxígeno durante el bioensayo varió 3.5±1.5 mgO ₂ /L. La hibridación se realizó con <i>C. elegans</i> .	86
Tabla VI	Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de <i>L. vannamei</i> sometidos al reto crónico de hipoxia 3.5±1.5 mgO ₂ /L, la temperatura durante el bioensayo varió 31±3°C. La hibridación se realizó con <i>C. elegans</i> .	87

LISTA DE ABREVIATURAS

A:	Absorbancia
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
BRA:	Branquias
EA:	Eficiencia de absorción.
FD:	Factor de dilución
HM:	Hemolinfa
HP:	Hepatopáncreas
HSP:	Proteína de choque térmico (Heat Shock Protein)
MUS:	Músculo
n:	Numero de organismos
OD:	Oxígeno disuelto
PC:	Potencial de crecimiento
PS:	Peso seco
TA:	Tasa de absorción
TH:	Tasa de excreción de heces
TI:	Tasa de ingestión
TR:	Tasa de respiración
TE:	Tasa de excreción de amonio
UPS:	Unidades prácticas de salinidad

GLOSARIO

Balance energético	Relación de los principales ingresos y egresos de energía en un organismo, establecidos a través de una ecuación.
Condición fisiológica	Cantidad de reservas de energía disponibles en un organismo.
Eficiencia de absorción	Porcentaje de materia orgánica del alimento suministrado que pasa a través de la pared del tubo digestivo en un organismo.
Estrés	Conjunto de respuestas fisiológicas de un organismo como reacción a un disturbio ambiental o metabólico que afecta su homeostasis.
Respuesta aguda	Alteración que sucede en un corto tiempo que va de minutos a horas y es producto de un estímulo súbito y puntual.
Respuesta crónica	Eventos fisiológicos que ocurren en un lapso que va de días a semanas, producto de un estímulo sostenido.
Hipertermia	Condición estresante provocada por el incremento de temperatura del ambiente.
Hipoxia	Condición estresante provocada por el déficit de oxígeno ambiental.
Microarreglo de ADN	Superficie sólida en la cual se une una colección de fragmentos de ADN que se usan para analizar la expresión diferencial de genes que son monitoreados de manera simultánea miles de ellos.
Microarreglo heterólogo	Microarreglo en el cual los genes del organismo estudiado, son hibridizados con genes de otra especie contenidos en el chip.
Microarreglo homólogo	Microarreglo en el cual los genes del organismo estudiado y los contenidos en el chip son de la misma especie.
Potencial de crecimiento	Energía libre con la que cuentan los organismos para funciones tales como crecimiento, reproducción y movimiento, entre otras.

Tasa de absorción	Materia orgánica que atraviesa la pared del tubo digestivo por unidad de tiempo.
Tasa de excreción de desechos nitrogenados	Cantidad de energía que es liberada como producto del catabolismo de proteínas en el organismo por unidad de tiempo.
Tasa de excreción de heces	Alimento que no es absorbida por el tubo digestivo eliminándose por el tracto digestivo por unidad de tiempo.
Tasa de ingestión	Cantidad de alimento que pasa a través de la boca hacia el tubo digestivo por unidad de tiempo.
Tasa respiratoria	Medida indirecta del metabolismo estimada por el consumo de oxígeno por unidad de tiempo. Es comúnmente usada como indicador de actividad del organismo.
Temperatura óptima	Temperatura a la cual los procesos biológicos de los organismos son más eficientes.

INTRODUCCIÓN

La industria camaronícola en México representa el 40% del total de su producción acuícola, con un volumen cercano a las 130 mil toneladas anuales y un valor estimado en más de 1,000 mdd siendo además una fuente importante de generación de empleos. Sin embargo, la producción en los últimos años ha sufrido pérdidas, generando falta de competitividad en la industria y desempleo, debido a problemas de enfermedades como el Síndrome del Virus de la Mancha Blanca (WSSV), la insuficiencia de post-larvas de calidad, el alto costo del alimento, la falta de espacios para la expansión y el efecto del entorno sobre los cultivos, entre los principales (CONAPESCA, 2011).

La mayor parte de los cultivos de camarón, se localizan en el noroeste del país en los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Colima y Baja California Sur en estanques de tierra, donde los ciclos varían dependiendo del clima de cada entidad. Se ha observado que en estos estanques durante el cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se alcanzan concentraciones bajas de oxígeno cerca del amanecer, llegando por debajo de 3 mg/L, producto de la respiración aeróbica bacteriana (Boyd y Watten 1989). Por otra parte, la temperatura promedio durante un ciclo de producción varía entre los 19 y los 32 °C, alcanzando en ocasiones los 34°C (Villarreal y Ocampo 1993). Adicionalmente, registros continuos tanto de temperatura como de oxígeno disuelto, en estanques de cultivo de diferentes entidades, han demostrado que se llegan a presentar condiciones ambientales extremas cuando el oxígeno está por debajo de los 2 mg/L y la temperatura se mantiene arriba de los 32 °C (Figura 1. Portillo y Magallón, coms pers). Probablemente, estas coincidencias son las causas de las mortalidades masivas observadas cuando los organismos se encuentran fuera de intervalos ambientales de tolerancia.

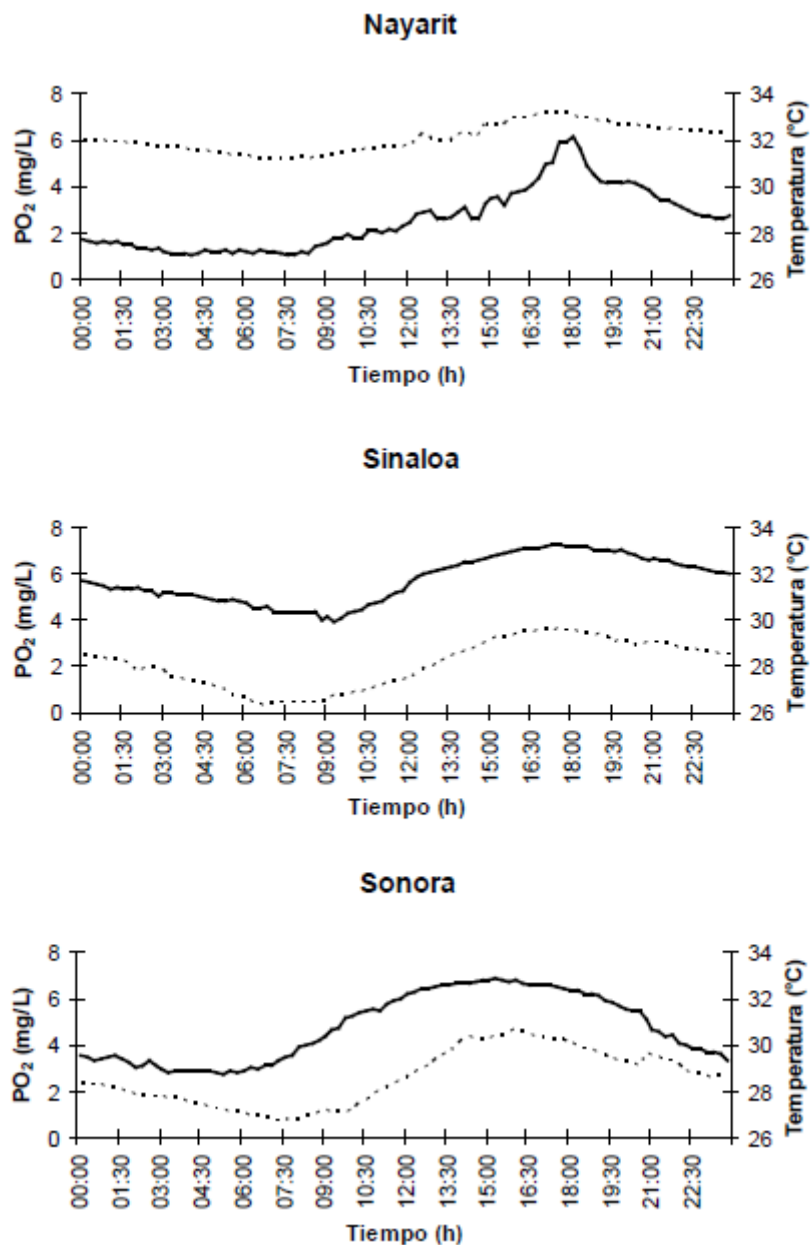


Figura 1. Patrones de variación diarios de oxígeno disuelto (línea sólida) y temperatura (línea punteada), registrados en estanques de cultivo de camarón durante los periodos de mayor mortalidad, en Sinaloa, Sonora y Nayarit. (Cortesía de G. Portillo y F. Magallón).

Lo anterior toma mayor relevancia sabiendo que entre las variables ambientales más importantes para los organismos se encuentran la temperatura y el oxígeno ya que ambos afectan su nivel de actividad metabólica. La temperatura es

considerada por muchos autores como un factor de primer orden porque aumenta o disminuye el nivel de actividad de los poiquiloterms provocando cambios en las necesidades energéticas, en la condición, el estado de salud y el crecimiento (Bayne, 1976, Armitage y Wall, 1982). El oxígeno disuelto, por otro lado, es un factor limitante para las especies acuáticas debido a que las reacciones metabólicas aerobias son controladas por su disponibilidad en el medio, por lo cual una baja concentración ocasiona cambios en el metabolismo de manera global (Boyd y Watten, 1989).

Por otra parte, el estrés se puede definir como un conjunto de respuestas fisiológicas de un organismo como reacción a un disturbio ambiental o metabólico que afecte la homeostasis de un organismo (Selye, 1956). En una escala temporal el estrés podemos clasificarlo en dos tipos: el estrés agudo, que es una alteración durante un corto periodo de tiempo (minutos, horas), producido por un evento súbito y puntual; y el crónico, producido por eventos ambientales a los que se encuentra sometido un organismo de mayor tiempo de duración (de varios días a semanas) (Zacarías-Soto 1997). Existen varias formas de evaluar el estrés en los organismos acuáticos: el potencial de crecimiento es una de ellas. Consiste en estimar la energía libre con la que cuentan los organismos para funciones tales como crecimiento, reproducción y movimiento, por medio de la ecuación de balance energético. El modelo de balance energético, considera a los organismos desde el punto de vista termodinámico, como un sistema abierto que intercambia energía con su ambiente, en tres formas: calor, trabajo y energía almacenada en compuestos bioquímicos (Rosas, *et al.* 2003a). La determinación del potencial de crecimiento (PC) se logra integrando las principales tasas fisiológicas (ingestión (TI), respiración (TR), excreción nitrogenada (TE) y excreción de heces (TH)), por medio de la ecuación del balance citado ($PC = TI - TR - TE - TH$). Debido a que las tasas fisiológicas se modifican en relación con los cambios ambientales, se espera que ante estrés ambiental, se presente una disminución del PC, representando así una herramienta muy útil para evaluar el grado de afectación de

los cambios ambientales en los organismos. Otra forma de evaluar los efectos de estrés, es por medio de los cambios en la condición fisiológica de los organismos (contenido bioquímico), esto es la cantidad de reservas de energía disponibles (Ferron y Leggett, 1994). Durante el estrés, los organismos utilizan la energía para abastecer la demanda energética provocada y trasladan reservas entre los diferentes tejidos. En el camarón los principales tejidos que sirven para evaluar estos movimientos son hepatopáncreas, la hemolinfa, los músculos y las branquias (Newsholme y Leech, 1983).

Otro aspecto importante es evaluar las respuestas adaptativas ante condiciones de estrés. Esto es, la capacidad de tomar rutas metabólicas alternativas, usando la información almacenada en el genoma para sintetizar un producto génico funcional (ARN) que ayude a contrastar o minimizar el daño provocado por el estrés. Gracias a que los genes en un organismo pueden ser activados o desactivados de acuerdo a las señales metabólicas que el núcleo celular recibe de factores internos tales como hormonas o externos como los estímulos ambientales, alimento, patógenos, en los últimos años, se ha relacionado la expresión de genes con la respuesta de los organismos a diversas condiciones. Por lo anterior, el análisis de la expresión es una herramienta útil para conocer las respuestas de los organismos bajo condiciones de estrés a nivel molecular. Particularmente la técnica de microarreglos, es una herramienta muy poderosa ya que a través de ésta se inmovilizan miles de genes y pueden ser evaluados bajo un mismo estímulo. Así mismo, la expresión de genes puede ser analizada en relación a la activación o inhibición de rutas metabólicas, en las cuales los genes están implicados (Logan y Somero, 2010).

En el presente trabajo, se estudiaron las relaciones entre los cambios fisiológicos, la distribución y almacenamiento de compuestos bioquímicos y la expresión, en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) tanto en las respuestas agudas como

crónicas bajo condiciones estresantes de temperatura y concentración de oxígeno disuelto, similares a las que ocurren en los estanques de cultivo ante eventos extremos.

ANTECEDENTES

Marco ambiental del camarón blanco

El camarón blanco *L. vannamei*, se desarrolla bien en un amplio rango de salinidades e incluso se ha llegado a cultivar experimentalmente en agua dulce (Scarpa y Vaughan, 1998); teniendo su mejor crecimiento en el intervalo entre 33 UPS y 40 UPS (Ponce-Palafox *et al.*, 1997). Su marco ambiental de temperatura va de 23 a 30 °C, siendo su crecimiento óptimo a los 28 °C (Martínez-Córdova, 1999). En relación al oxígeno disuelto, el desarrollo de *L. vannamei* ha sido determinado entre 3 y 5 mg/L (Lucien-Brun, 1989); y aunque se desconoce su límite de tolerancia a este factor, en especies de peneidos incluidos *Penaeus japonicus*, *Penaeus schmitti* y *Penaeus monodon*, niveles entre 0 y 1 mg/L son letales en respuesta aguda, entre 1 y 1.5 mg/L son letales en exposición prolongada y, niveles entre 1.7 y 3.0 mg/L provocan retardo en el crecimiento de los organismos y susceptibilidad a enfermedades (Ahuejote-Sandoval, 2004).

Potencial de crecimiento

Diversos estudios han revelado que las tasas fisiológicas se ven afectadas tanto por factores internos (estadio de muda, edad, genética poblacional, etapa reproductiva, etc.), así como factores externos (condiciones ambientales, alimentación, exposición a patógenos, densidad de cultivo y manipulación, entre otros). Dentro de las condiciones ambientales, la temperatura, el oxígeno disuelto, los niveles de amonio y la salinidad; son las causas más comunes de estrés,

teniendo entre los más relevantes la temperatura y el oxígeno disuelto, debido a su impacto en los organismos (Newman, 2000).

En crustáceos, la tasa respiratoria es afectada por variables ambientales como salinidad, oxígeno disuelto, temperatura, intensidad de la luz (Bridges y Brand, 1980), y por variables endógenas como edad, estado nutricional, sexo, actividad, estadio de muda, ritmo biológico (Wolvekamp y Waterman, 1960). Kurmaly *et al.*, (1989), reportaron una relación inversa entre el consumo de oxígeno y la edad de las larvas de *P. monodon*. También se conoce que *Metapenaeus monoceros* presenta tasas respiratorias menores a salinidades bajas (20 y 25 UPS) en relación a salinidades de 30 y 35 UPS (Pillai y Diwan, 2002). Li *et al.*, (2006), observaron que la tasa respiratoria se incrementa cuando los camarones se alimentan a saciedad, comparados con los camarones en inanición. Li *et al.*, (2007), trabajando con juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) observaron que el consumo de oxígeno a 3 UPS es significativamente más alto que a salinidades más elevadas.

Por otra parte la tasa de excreción de amonio se ve afectada por factores tanto internos como el tamaño corporal y el estado del ciclo de muda; y factores externos como la temperatura, la salinidad y la concentración del oxígeno disuelto (Rosas, *et al.*, 1999). Los invertebrados acuáticos excretan la mayor parte del exceso de nitrógeno producido durante el catabolismo de los aminoácidos y proteínas principalmente como amonio, representando entre el 70 y 90% de los productos del metabolismo de las proteínas (Rosas, *et al.*, 2003). En los camarones, la excreción de amonio se incrementa cuando la salinidad es alta y ante los cambios abruptos en la temperatura, como se ha reportado para varias especies *Fenneropenaeus indicus*, *Marsupenaeus japonicus*, *P. monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Farfantepenaeus aztecus*, *L. vannamei*, *M. monoceros* y *L. stylirostris* (Gerhardt, 1980; Chen y Lai, 1993; Chen, *et al.* 1994; Chen y Lin,

1995; Hernández y Díaz, 1995; Jiang *et al.* 2000, Pillai y Diwan, 2002; Re *et al.* 2004). También Rosas *et al.*, (1999), reportan que la excreción del amonio en juveniles del camarón *L. setiferus*, disminuye en proporción directa con la baja concentración del oxígeno disuelto a salinidades de 15 y 35 UPS.

Son pocos los estudios realizados donde se ha utilizado la ecuación del balance energético en camarones penéidos. Rosas, *et al.* (1998), evaluaron los efectos del oxígeno disuelto durante el crecimiento de postlarvas de *P. setiferus* reportando que hay una disminución en la producción de biomasa y la energía asimilada del alimento conforme disminuye el nivel de oxígeno disuelto. Sin embargo, estos autores también encontraron que la cantidad de energía asimilada se mantiene constante aun con la reducción del oxígeno disuelto (4mg/L).

Kurmaly *et al.* (1989a, b), observaron que el potencial de crecimiento es inversamente proporcional a la edad de las larvas de *P. monodon*. Y Lemos y Phan (2001), reportaron que las larvas de *Farfantapenaus paulensis* requieren por hora 3.63 J/larva para su crecimiento óptimo.

Contenido bioquímico

Existen numerosos trabajos que involucran los cambios metabólicos en tejidos de crustáceos debido a exposición a agentes estresores. En general, el estrés provoca cambios metabólicos que tienen la finalidad de producir la energía necesaria para reestablecer la condición de equilibrio. En relación a esto, se han propuesto diversos indicadores metabólicos como respuesta al estrés: el más clásico son los niveles de glucosa y lactato en hemolinfa (Hall y Van Ham 1998; Racotta y Palacios, 1998; Pascual *et al.*, 2003b; Mercier *et al.*, 2006; Mugnier *et al.*, 2008); aunque también se han utilizado cambios observados en proteínas,

lípidos y carbohidratos, para evaluar el efecto del estrés en camarones ante diversos estímulos en los tejidos de hemolinfa, hepatopáncreas, músculo y branquias (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Mercier *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 2006).

En relación al uso de la energía, la fuente primaria de energía para crustáceos son las proteínas (New, 1976) y el músculo es el principal tejido de almacén (Buckup *et al.*, 2008). Rosas *et al.* (2000), señalaron que, aunque las proteínas funcionan principalmente como moléculas estructurales y catalizadores biológicos, los camarones penéidos están adaptados para utilizarlas como fuente de energía a partir del combustible circulante (los aminoácidos), que obtienen de la dieta o por hidrólisis de las mismas. En experimentos realizados con *L. setiferus* expuestos a alta temperatura (33 °C), se observa una reducción del contenido proteico en tejidos de reserva (músculo, hemolinfa) asociada a la utilización de estas moléculas como un mecanismo de compensación por el estrés causado (Pascual *et al.*, 2003b). En *P. monodon* y *P. japonicus* se ha documentado una disminución en los niveles de proteínas en hemolinfa expuestos a baja salinidad y altos niveles de amonio (Chen *et al.*, 1994). Sánchez *et al.* (2001), reportaron una disminución en los niveles de proteína en hemolinfa de adultos de *L. setiferus* al comparar organismos silvestres con organismos aclimatados a 27 °C y 30 °C.

Por otra parte, el uso de los carbohidratos, en camarones peneidos es limitado, debido a que carecen de sitios para almacenarlos y capacidad de procesamiento enzimático (Rosas *et al.*, 2000). Sin embargo, durante situaciones de estrés, se ha demostrado que estos organismos recurren a los carbohidratos para hacer frente a un reto dado. Cuando los camarones peneidos son sometidos a estrés de corta duración ocasionados por cambios ambientales (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Racotta *et al.*, 2002; Mugnier *et al.*, 2008); o manejo (Racotta y Palacios, 1998; Mercier *et al.*, 2006; Aparicio-Simón *et al.*, 2010); los efectos por estrés

agudo se ven reflejados en una marcada hiperglicemia en hemolinfa. Sin embargo, se ha observado que en *L. setiferus* la exposición crónica de camarones peneidos a altas temperaturas (33°C), produce disminución de glucosa en la hemolinfa para el día 5 con recuperación en días posteriores; cambio asociado a una disminución en el metabolismo de glucosa o a su utilización como un mecanismo de compensación en respuesta al estrés (Pascual *et al.*, 2003b). Por otro lado, en condiciones de hipoxia, los camarones peneidos, metabolizan la glucosa hasta lactato a través del metabolismo anaerobio aumentando su contenido en hemolinfa (Paterson, 1993; Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández, 2000; Pérez-Rostro, 2004; Mercier *et al.*, 2006; Aparicio-Simón *et al.*, 2010). En crustáceos, diversos autores han encontrado que la glucosa es almacenada en forma de glucógeno en hepatopáncreas, músculos y branquias, para ser utilizada en respuesta a cambios ambientales como hipoxia, salinidad e inanición (Oliveira y Da Silva 2000; Oliveira *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Buckup *et al.*, 2008).

Los lípidos representan la principal reserva de energía química en muchos animales y se depositan en las células en forma de triglicéridos. Estas sustancias contienen seis veces más energía que los carbohidratos y las proteínas como reservas energéticas (Newholme y Leech, 1983). En camarones peneidos se ha observado que en condiciones de ayuno y manipulación durante lapsos largos de tiempo (3-4 semanas), los lípidos se degradan para obtener energía emergente y por lo tanto disminuyen (Pascual *et al.*, 2006; Mercier *et al.*, 2006). Sin embargo, no existen trabajos concluyentes respecto a cambios en su contenido por hipoxia o hipertermia. En los camarones, los triglicéridos son indispensables proveedores de energía concentrada predominantemente en hepatopáncreas y ovarios (Bray *et al.*, 1990). Se ha registrado en *L. setiferus*, que la exposición a altas temperaturas (33 °C), provoca una disminución de triglicéridos en los primeros 5 días en hepatopáncreas, músculo y hemolinfa, asociado al uso de estas moléculas como un mecanismo de compensación agudo en respuesta al estrés, recuperando niveles para el día 6 (Pascual *et al.*, 2003b). Se ha observado disminución de

triglicéridos en hemolinfa debido a aclimatación en *L. setiferus* tanto a 27 °C, como a 31 °C durante 7 días (Sánchez *et al.*, 2001), y en *L. vannamei* por manipulación prolongada (4 semanas) (Mercier *et al.*, 2006).

El colesterol es otra de las biomoléculas implicadas en respuesta a estrés en crustáceos, ya que se ha observado que el contenido tiende a disminuir. Esta sustancia es precursor de esteroides como los ácidos biliares, hormonas esteroides, hormonas sexuales y del control de la muda en crustáceos e insectos, por lo que es de importancia para conocer la respuesta hormonal global del organismo. En camarones peneidos se observó la disminución del contenido de colesterol en hemolinfa durante la exposición a niveles altos de amonio (Racotta y Herrera, 2000) y por hipertermia (Pascual *et al.*, 2003b). Silva-Castiglioni *et al.* (2010), observaron el mismo patrón en hepatopáncreas y músculo en respuesta a hipoxia, en *L. vannamei*.

Los carotenoides son antioxidantes importantes para los crustáceos (principalmente astaxantina) por favorecer sus respuestas inmunes. En *L. vannamei* son pocos los estudios realizados que abordan el contenido de carotenoides y la mayoría se centran en variaciones causadas por diferentes dietas (Meyers, S.P., 2000). Aparentemente estos compuestos no juegan un papel relevante en respuesta al estrés ya que en hepatopáncreas, no se observaron cambios en la concentración de este compuesto debido a hipoxia (Perez-Rostro *et al.*, 2004), ni por manejo constante (Mercier *et al.*, 2006).

Expresión

A pesar de los avances en la biología molecular en los camarones estas respuestas son poco conocidas. Lo anterior, se debe a que la mayoría de los

trabajos realizados en el campo de la genética con camarones, se han enfocado en la respuesta inmune y al comportamiento reproductivo, por lo que existen pocos estudios relacionados a los cambios provocados por estímulos ambientales.

En el caso de los efectos térmicos, existen diversos trabajos principalmente en peces que evaluaron las respuestas celulares a nivel proteómico, es decir, destacando la regulación de genes para biosíntesis de proteínas, particularmente proteínas reguladoras o reparadoras de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés). Logan y Somero (2010), realizaron un estudio para observar la respuesta de aclimatación a distintas temperaturas (9, 19 y 28 °C) en el pez *Gillichthys mirabilis*, observando que, a temperaturas más altas se presenta sobreexpresión en genes de biosíntesis y recambio de proteínas, y de transporte activo de membrana. En la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*), se observó la expresión de genes de proteínas de choque térmico que actúan para la reparación del daño (HSP70, HSP90, HSP30, entre otras), bajo condiciones de estrés por temperatura (Quinn *et al.*, 2011). Esto también fue documentado para las proteínas HSP70 y HSP90, que actúan como chaperonas fundamentales en procesos fisiológicos celulares (Guo *et al.*, 2010, Li y Brouwer, 2009). De la Vega *et al.* (2007), sometieron a organismos de *P. monodon* a estrés por temperatura (35 °C), observando por medio de la técnica de microarreglos, la represión de genes de retro-transposones sin repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés).

En respuesta a hipoxia en organismos marinos, se ha observado que se modifica la expresión de genes relacionados con crecimiento celular y producción de ATP. Se sabe que algunos mamíferos sobreviven a lapsos de hipoxia a través de la regulación de genes relacionados con la síntesis de proteínas, locomoción, metabolismo anaerobio, producción de ATP y la gluconeogénesis (Lutz y Prentice, 2002). Dentro de las respuestas más importantes observadas en organismos marinos está la represión de genes involucrados en la síntesis de proteínas,

mientras que aquellos que participan en la producción del ATP vía glucólisis y gluconeogénesis se sobre-expresan, observando que el organismo se encuentra suprimiendo el crecimiento celular y aumentando procesos para producción o almacenamiento de energía (Wu, 2002; Boutilier y Pierre, 2000). Van der Meer *et al.* (2005), sometieron al pez cebra (*Danio rerio*) a hipoxia crónica y analizaron la expresión de genes en branquias a través de microarreglos, observando un aumento en la expresión de genes codificantes para el transportador de oxígeno mioglobina y acumulación de colesterol y glucolípidos. Sin embargo, no existen trabajos donde se induzca la expresión de estos genes o que indiquen que el gen de la hemocianina aumenta debido a hipoxia en crustáceos marinos. En camarones peneidos existen pocos trabajos de la respuesta a hipoxia. Se ha observado en *L. vannamei* que esta respuesta está controlada principalmente por el gen codificante para el factor inducible de hipoxia (HIF-1), un heterodímero compuesto por las subunidades α y β . Este compuesto se ha descrito como un sensor en crustáceos marinos que regula la acción del metabolismo anaerobio, mediante la activación o desactivación de genes relacionados con la síntesis de acarreadores de oxígeno, transportadores de glucosa o enzimas glucolíticas entre otros (Soñanez-Organis *et al.*, 2009, Soñanez-Organis *et al.*, 2010). En trabajos con *F. chinensis*, expuestos a hipoxia se encontró activación de genes involucrados en las rutas de glucólisis y gluconeogénesis considerándose algunos (enolasa y fosfopiruvato hidratasa) como característicos de respuesta a hipoxia en crustáceos (Jiang *et al.*, 2009). También se han observado cambios en genes relacionados con el metabolismo de lípidos en *P. pugio* siendo los de metabolismo de ácidos grasos, de transporte de lípidos y de síntesis de colesterol y leicopenos los más informativos en respuesta a hipoxia (Li y Brouwer, 2009). Rathburn *et al.* (2013), expusieron organismos a hipoxia por 4 h y 24 h trabajando con *L. vannamei* y analizaron la expresión génica utilizando microarreglos, observando inhibición de genes de balance energético, biogénesis del ribosoma y síntesis de proteínas. Puntualizaron el aumento del gen de la enzima arginina quinasa y la chaperona HSP70 entre las más importantes, los cuales son usados como

estrategia para almacenamiento de ATP la primera, y como protección contra estrés oxidativo a nivel celular la segunda.

JUSTIFICACIÓN

En la zona noroeste de México se ubican granjas productoras de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con alto valor económico, que se ven afectadas por el clima de cada entidad. Existen pocos estudios fisiológicos y de expresión en esta especie que consideren las variaciones reales que afectan a los cultivos. Es necesario entender las respuestas fisiológicas, los cambios en contenido bioquímico asociados y la relación con la expresión para hacer frente al estrés ambiental impuesto por las altas temperaturas y bajos niveles de oxígeno presentes en las granjas de cultivo, tanto a corto como a largo plazo. Lo anterior ayudará a sentar indicadores para la mejora del cultivo.

HIPÓTESIS

Las variables ambientales determinan cambios fisiológicos en los organismos marinos, que se ven reflejados en las tasas fisiológicas, la forma en que se usa la energía y la expresión. Por lo tanto, si el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), es sometido a condiciones estresantes de temperatura y oxígeno disuelto, recurrirá a cambios para compensar el estrés provocado y se observarán modificaciones en las tasas fisiológicas, el contenido bioquímico y la expresión de rutas metabólicas.

OBJETIVOS

General

- Establecer relaciones entre las respuestas fisiológicas, el contenido bioquímico y la expresión del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia.

Específicos

- Establecer los cambios en las tasas fisiológicas implicadas en el cálculo del potencial de crecimiento, en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) en respuesta a cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia.
- Determinar el contenido bioquímico en los tejidos de hemolinfa, branquias, hepatopáncreas y músculo en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia.
- Observar los cambios en las principales rutas metabólicas expresadas y reprimidas en branquias de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia.
- Relacionar las respuestas fisiológicas, el contenido bioquímico y la expresión en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) ante cambios agudos y crónicos de hipertermia e hipoxia.

METODOLOGÍA

DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental consistió en someter a organismos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) aclimatados a condiciones óptimas de temperatura y oxígeno disuelto, a un cambio abrupto de temperatura alta y de hipoxia para evaluar las respuestas agudas de tasas fisiológicas, contenido bioquímico y de expresión. Simultáneamente y en un segundo grupo de organismos, se mantuvieron las mismas condiciones experimentales de forma cíclica para evaluar la respuesta crónica con las mismas variables, simulando lo que ocurre en los estanques de cultivo en condiciones sub-óptimas.

ORGANISMOS EXPERIMENTALES

Origen

Organismos juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con un peso promedio aproximado de 11 g, fueron obtenidos para el presente estudio de la granja productora de reproductores Acuicultura Mahr, S.A. de C.V. ubicada en el Km 1 Carretera a Pichilingue La Paz, B.C.S. Los organismos fueron extraídos de estanques supralitorales de cultivo expuestos a cambios naturales ambientales de temperatura respectivos a la zona. El control de oxígeno en estos cultivos es a través de la operación de aireadores dentro de los estanques. Los organismos fueron extraídos por medio de un chinchorro y se seleccionaron organismos de una talla aproximada de 11 g que se observaban activos. Posteriormente, los organismos fueron colocados dentro de un tanque de 1000 L conteniendo agua marina filtrada a 20 μm , ozonificada y con aireación constante por medio de un compresor de aire conectado a la corriente eléctrica de un vehículo pick-up.

Previamente, en el interior del tanque se encontraba una malla plástica para facilitar la extracción de los organismos.

El traslado se realizó a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), durando aproximadamente 40 minutos y los organismos fueron extraídos del tanque cuidadosamente usando una malla plástica y colocándolos dentro de tinas de fibra de vidrio de 500 L con agua marina filtrada a 5 μ m, con salinidad 40 UPS, aireada a saturación y mantenida a temperatura controlada de 28 °C. Las tinas fueron cubiertas con una malla para mantener a los organismos en su interior (Figura 2).

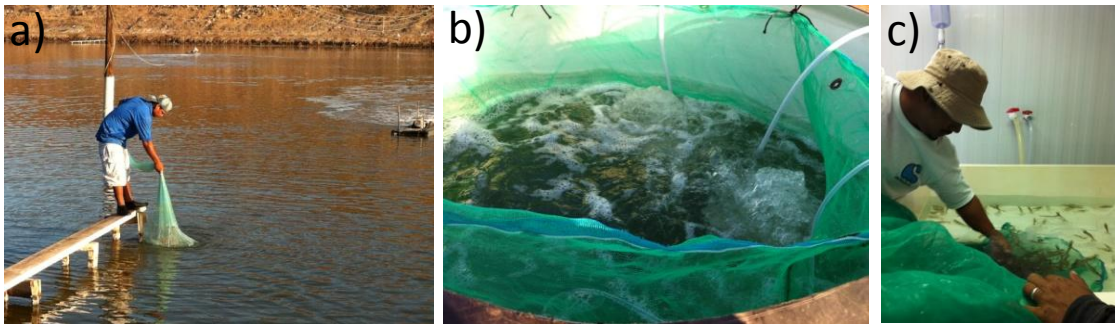


Figura 2. a) Proceso de extracción de organismos experimentales de la granja productora de reproductores Acuicultura Mahr, S.A. de C.V., b) detalle del tanque de traslado que muestra los aireadores y la malla colocada en el interior y c) proceso de liberación de los organismos en las tinas del laboratorio para su aclimatación.

Aclimatación

Los organismos fueron aclimatados por 2 semanas bajo las condiciones descritas, a una densidad de 1 organismo/5 L de agua. Se mantuvo un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad y se alimentaron con pellets marca Azteca® a razón del 2.75 % de su peso húmedo dividido en dos porciones al día. Diariamente se hizo un recambio de agua del 50 % eliminando las heces por medio de un sifón y los organismos muertos se sacaron para conservar la calidad del agua.

CONTROL DE VARIABLES AMBIENTALES

Se llevó a cabo el montaje de un sistema llamado ECOSIM, capaz de controlar simultáneamente de forma estable u oscilante diferentes variables ambientales para recrear ambientes controlados (Sicard *et al.*, sin publicar). De esta forma fue posible controlar las condiciones de temperatura y oxígeno disuelto acorde al diseño experimental.

BIOENSAYOS

Para todos los bioensayos se seleccionaron organismos en estadio de muda C (intermuda) de acuerdo al método descrito por Smith y Dall (1985). El estadio de muda de los organismos se determinó con ayuda de un estereoscopio o de un transiluminador y lupa (Figura 3). Antes de iniciar cada medición y muestreos, los organismos fueron puestos en ayuno durante 12 h para evitar interferencia en los resultados debido al metabolismo.

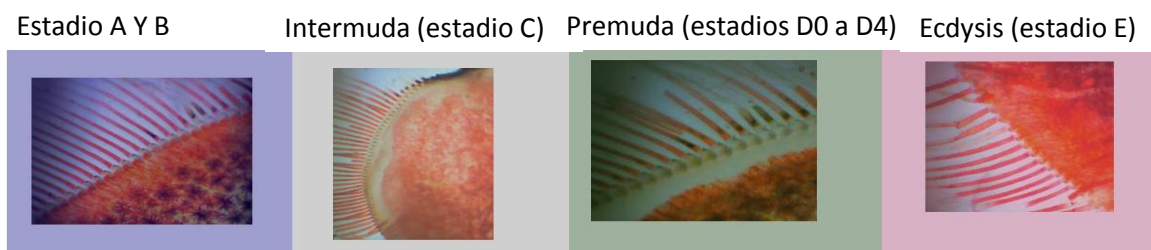


Figura 3. Vista de los diferentes estadios de muda en camarón blanco (*L. vannamei*) (Smith y Dall, 1985).

Exposición al reto agudo de temperatura

Durante el reto térmico agudo, los organismos fueron expuestos a un cambio repentino de temperatura de 34 °C. Previamente fueron distribuidos en 6 tinajas de

100 L con agua marina filtrada a 5 μm y mantenidos durante 2 h en condiciones óptimas de 28°C, 5 mgO₂/L y 40 UPS sin perturbar, para evitar estrés por manejo. Posteriormente la temperatura se incrementó a una tasa de 4 °C/h hasta alcanzar los 34 °C, reto que se mantuvo durante 2 h. Después de este tiempo, la temperatura bajó a la misma tasa hasta alcanzar los 28 °C conservando las condiciones óptimas por 24 h (Figura 4). Para evaluar los cambios por efecto del reto provocado, se muestrearon organismos en la etapa previa (control), durante el reto y en la recuperación (a las 24 h).

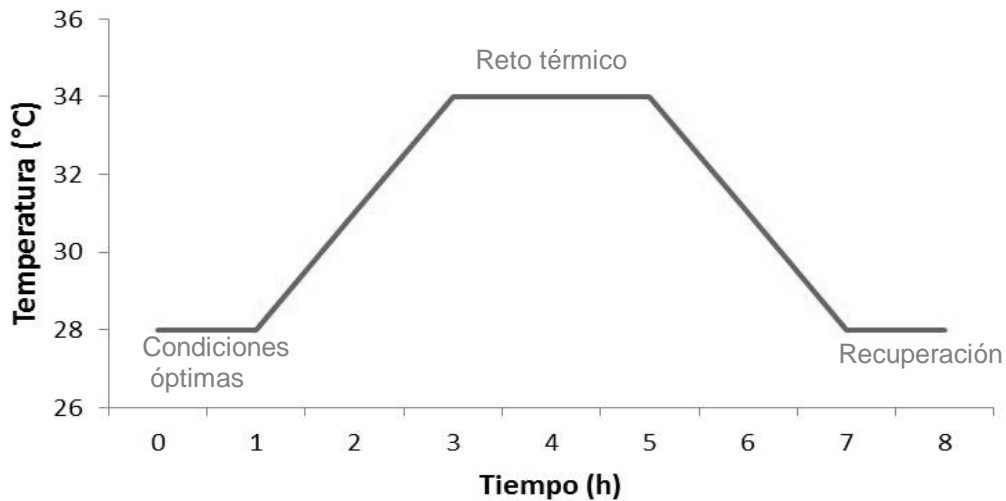


Figura 4. Diseño del cambio agudo de temperatura al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso.

Exposición al reto agudo de oxígeno

Durante el reto agudo de oxígeno, los organismos fueron expuestos a un cambio repentino de oxígeno de 2 mgO₂/L. Previo al reto, se mantuvieron de la misma forma descrita que en el reto térmico y posteriormente la concentración de oxígeno se bajó a una tasa de 1.5 mgO₂/L/h hasta los 2 mgO₂/L. Ésta condición se mantuvo durante 2 h y después la concentración de oxígeno se incrementó a la

misma tasa hasta alcanzar los 5 mgO₂/L conservando las condiciones óptimas por 24 h (Figura 5). De la misma forma que en el reto térmico, se muestrearon organismos para evaluar los cambios provocados por el reto en la etapa previa (control), durante el reto y en la recuperación (a las 24 h).

Exposición al reto crónico combinado de temperatura y oxígeno

El reto crónico se logró exponiendo a los organismos a variaciones simultáneas de $31 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ y de oxígeno $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los organismos fueron introducidos en una tina de 800 L conteniendo 500 L de agua marina filtrada a 5 μm conectadas al ECOSIM. En la simulación realizada la temperatura fue controlada a 34 $^\circ\text{C}$ por las tardes y de oxígeno disuelto 2 mgO₂/L por la madrugada para emular las condiciones estresantes de ambos factores que se presentan en los estanques de cultivo (Boyd y Watten, 1989). Para evaluar las respuestas, los organismos se muestrearon durante la mañana (hipertermia) y por la noche (hipoxia), en un periodo inicial (día 1), intermedio (día 14) y final (día 28) (Figura 6).

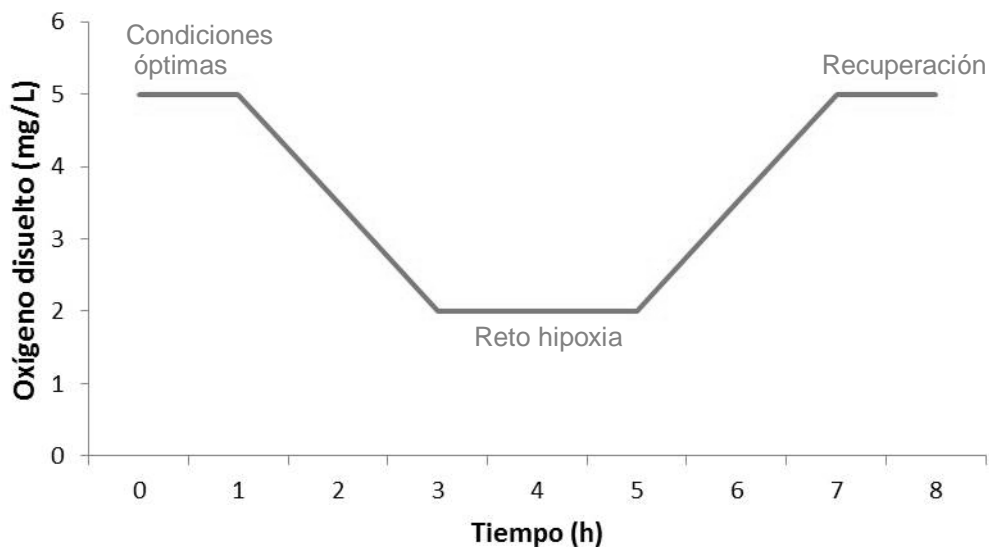


Figura 5. Diseño del cambio agudo de oxígeno al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso.

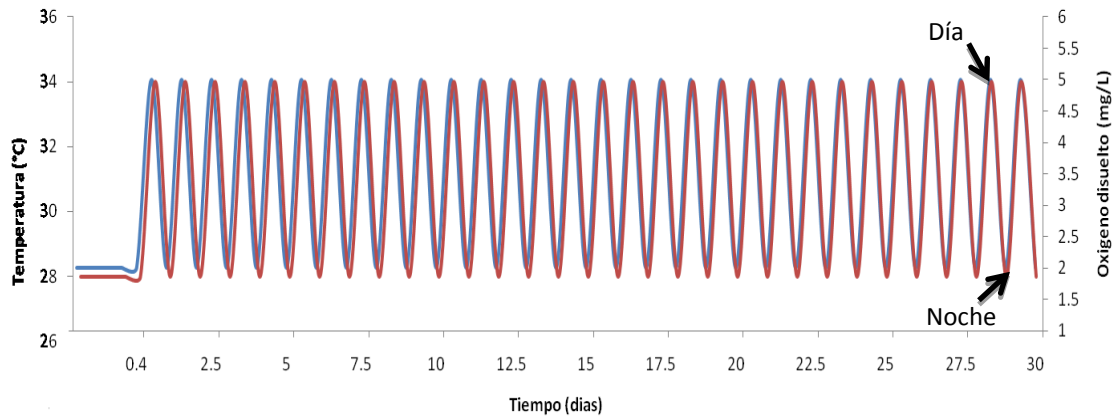


Figura 6. Diseño de la oscilación térmica (rojo) y de oxígeno disuelto (azul) a la que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, durante el reto crónico a 28 días.

TEJIDOS

Muestreo

Los organismos muestreados para cada uno de los retos descritos anteriormente fueron: 10 para potencial de crecimiento, 12 para contenido bioquímico y 20 para observar la expresión. Una vez que los organismos fueron muestreados, se procedió a la extracción de tejidos como se describe a continuación:

La extracción de hemolinfa se realizó atravesando la membrana artroidal del seno ventro-lateral del abdomen por medio de una jeringa estéril para insulina de 1 mL con aguja removible (Figura 7). Previamente la jeringa fue cargada con 500 μ L de una solución anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.3) con la cual se mezcló la hemolinfa al momento de ser extraída. Una vez extraída, la hemolinfa se vertió en un tubo eppendorf para separar los hemocitos del plasma, centrifugando a 1300 X g durante 10 min, a 4 °C. El plasma se colocó en un tubo limpio para realizar los análisis bioquímicos.

Posterior a la extracción de la hemolinfa, los organismos se sacrificaron por medio de un corte rápido de la región cefálica y se obtuvieron las branquias, hepatopáncreas y músculo. Las branquias fueron extraídas separando el caparacho, arrancándolas con un fórceps desde su base. La extracción de hepatopáncreas se realizó haciendo una disección para retirar este tejido del tubo digestivo. El músculo se obtuvo retirando el exoesqueleto del abdomen y cortando septos abdominales con un bisturí.



Figura 7. Extracción de hemolinfa en camarones (fotografía tomada de Pascual *et al.*, 2003).

Preservación de muestras

Una vez realizado cada muestreo, los restos de cada organismo se introdujeron en tubos falcon y los tejidos extraídos en tubos eppendorf de 2 mL, ambos tubos previamente pesados a fin de conocer la cantidad exacta de tejidos en fresco. Los tejidos extraídos fueron fragmentados en pequeñas porciones; pesándose 0.1 g con ayuda de una balanza analítica digital (Precisa XT 320M). Una fracción de tejido de branquias fue preservado para el análisis de expresión en RNAlater. Inmediatamente después, los tubos fueron enfriados en nitrógeno líquido (-200

°C) y preservados en un ultracongelador (So-Low Fisher U85-25) a -80 °C. La liofilización para análisis bioquímicos y fisiológicos se realizó posteriormente en una liofilizadora (Virtis 249193) de 5 L de capacidad durante 24 h o hasta que se observó el color característico del tejido liofilizado y posteriormente se obtuvo el peso seco del organismo. En el caso de los tejidos, se calculó el porcentaje de humedad y después se procedió a hidratar y homogenizar las muestras con agua desionizada y arena libre de materia orgánica con un homogenizador (Fast-prep24) durante 20 s para obtener un extracto crudo (aproximadamente 1 mL de diluyente por 0.1 g de tejido) cuando fue necesario. En el caso de la hemolinfa, se tomó directamente junto con la solución anticoagulante y se hicieron diluciones con agua destilada como se indica en cada caso.

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS

Sistema de incubación

Las tasas fisiológicas fueron evaluadas en 10 organismos de manera individual manteniéndolos dentro de un sistema de cámaras de flujo continuo descrito por Sicard (2006). Adicional a las 10 cámaras de incubación con organismos, se mantuvieron dos cámaras adicionales sin organismos consideradas como blancos. Una vez que las cámaras fueron selladas, dos terceras partes de la altura de las cámaras fueron sumergidas en agua a manera de baño María en la cual la temperatura fue mantenida por medio del ECOSIM. La manguera de salida de cada cámara fue colocada en un distribuidor (Figura 8).

El agua entrante se mantuvo a un flujo de 50 mL/min bajo las condiciones de cada reto. Cada organismo se alimentó con el alimento descrito anteriormente, con una ración previamente pesada dejando el alimento a su disposición por 1.5 h, durante este tiempo se determinaron las tasas de respiración y excreción de amonio.

Posteriormente se extrajo el alimento no ingerido y las heces producidas. Previo al reto, se realizaron incubaciones con organismos mantenidos a las condiciones óptimas, los cuales fueron considerados como organismos control. Para los organismos problema, las determinaciones fisiológicas se realizaron a las 2 h posteriores a alcanzar el respectivo reto y a las 12 h para observar la capacidad de recuperación.



Figura 8. Sistema de incubación de cámaras para la determinación de tasas fisiológicas.

Tasas Fisiológicas

En cada reto descrito anteriormente se realizó la estimación de las tasas fisiológicas implicadas en la ecuación de balance energético (de ingestión, respiratoria, de excreción de amonio y eficiencia de absorción), como se describe a continuación.

Tasa de Ingestión

La tasa de ingestión se estimó midiendo el consumo de alimento por hora y referida al peso seco de tejido de cada organismo. El alimento no ingerido se succionó por medio de una pipeta pasteur del fondo de la cámara posterior a un

tiempo de alimentación de 1.5 h. Después, se colocó sobre un filtro de fibra de vidrio de 2.5 cm, previamente llevado a peso constante y se filtró por medio de una bomba de vacío. Los filtros con alimento se lavaron con agua destilada para eliminar las sales, se secaron a 65°C y se llevaron a peso constante, para obtener el contenido orgánico, más el inorgánico del alimento. Posteriormente los filtros fueron incinerados en una mufla a 450°C por 4 h y nuevamente se llevaron a peso constante para tener el peso seco libre de materia orgánica del alimento. El consumo de alimento se calculó por la diferencia entre el peso de la ración colocada en la cámara de incubación, menos el peso del alimento no ingerido. A esta diferencia se le restó el peso del alimento perdido por lixiviación durante la incubación, obtenido del alimento de la cámara blanco (sin organismo). La tasa de ingestión (TI) (mg/g/h) se calculó con la siguiente manera:

$$TI = \text{Consumo de alimento} / \text{Peso Seco} * \text{tiempo de incubación}$$

Eficiencia de absorción

La eficiencia de absorción (%) se estimó por el método de Conover (1966), el cual relaciona el contenido de materia orgánica e inorgánica en muestras de alimento y heces mediante la ecuación:

$$EA = (F - E) / (1 - E) F$$

Donde:

F= es el contenido de material orgánico del alimento / peso total del alimento

E= es el contenido de material orgánico de las heces / peso total de las heces

El contenido de material orgánico del alimento se obtuvo de los datos de la tasa de ingestión, mientras que el contenido de heces se obtuvo a partir de la extracción de heces desde el fondo de la cámara con una pipeta pasteur después de un

periodo de alimentación de 2 h. A partir de las muestras de heces en los filtros, se siguió el procedimiento descrito anteriormente para el alimento no ingerido para obtener el contenido de materia orgánica e inorgánica de las heces.

Tasa de absorción

La tasa de absorción (TA) en mg/g/h se calculó mediante la fórmula:

$$TA = TI * EA$$

Los resultados se expresaron en g/g/h y fueron convertidos a unidades energéticas utilizando el equivalente energético por gramo del alimento suministrado de acuerdo con el fabricante Azteca® (4231.71 Cal/g).

Tasa respiratoria

La tasa respiratoria se calculó midiendo el consumo de oxígeno por el flujo de la cámara de incubación entre el peso seco de tejido de cada organismo. El consumo de oxígeno fue estimado con la diferencia entre el promedio del oxígeno disuelto de la cámara blanco sin organismos menos el oxígeno disuelto de cada cámara conteniendo un organismo. La medición de oxígeno disuelto se realizó por medio de un sensor de oxígeno de fibra óptica (microoptode) de 50 µm de diámetro del oxímetro Microx TX2. La tasa respiratoria (TR) en mgO₂/g/h se calculó por medio de la ecuación:

$$TR = (\text{Consumo de oxígeno} * \text{Flujo}) / \text{Peso seco de tejido}$$

Los resultados de TR fueron convertidos a unidades energéticas utilizando el equivalente energético de 14.3 J/mg O₂ consumido (Lucas 1993).

Tasa de excreción de amonio

La tasa de excreción de amonio se midió estimando la producción de amonio por el flujo de la cámara entre el peso seco de tejido de cada organismo. La producción estimada midiendo el contenido de amonio en cada cámara con organismo menos el contenido de amonio promedio de las cámaras control sin organismos. La cuantificación de amonio por el método de flujo-inyección análisis propuesto por Hunter y Uglow (1993), para esto, se tomaron muestras de agua de 2 mL a la salida de cada cámara en tubos eppendorf a los 90 minutos después de retirar el alimento no ingerido y las muestras de agua se preservaron a -20 °C. El cálculo de esta tasa de excreción de amonio (TE) en mgNH₄/mL se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$TE = (\text{Excreción de amonio} \times \text{Flujo}) / \text{Peso seco de tejido}$$

Los resultados de TU fueron convertidos a unidades energéticas utilizando el equivalente energético de 20.5 J/ mgNH₄ excretado (Lucas, 1993).

Potencial de Crecimiento

Una vez que se estimaron las diferentes tasas fisiológicas y la eficiencia de absorción, los valores obtenidos se expresaron en unidades de energía (Joules/g/h) como se mencionó anteriormente y se integraron a la ecuación de balance energético propuesta por Warren y Davis (1967) para calcular el potencial de crecimiento (PC) en J/g/h:

$$PC = TA - (TR + TE)$$

Para evaluar la capacidad de respuesta a corto y largo plazo, de acuerdo al diseño experimental planteado, se realizó una comparación entre la respuesta aguda por cambios repentinos de temperatura y oxígeno y las respuestas crónicas por exposición a una condición sostenida.

Pigmento respiratorio (hemocianina)

La concentración de hemocianina se determinó a partir del plasma que se obtuvo de la centrifugación de la hemolinfa a 1300 X g durante 10 minutos a 4 °C. A continuación se realizó una dilución del plasma 1:20 con solución isotónica de crustáceos (SIC: NaCl 450 mM y KCl 10 mM por litro). Posteriormente, las muestras fueron colocadas en celdas de 1 mL y estas a su vez en un espectrofotómetro para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 335 nm.

La concentración de hemocianina por mL de hemolinfa se calculó de acuerdo al coeficiente de extinción (E1%) de 2.83 de una solución de hemocianina al 1% (10 mg/mL) en una fotocelda de 1 cm (Chen *et al.*, 1994; Racotta y Hernández-Herrera, 2000) de la siguiente manera:

$$\text{Hemocianina (mg/mL)} = (\text{Absorbancia} \times \text{Factor de Dilución} \times 10) / 2.83$$

CONTENIDO BIOQUÍMICO

Las técnicas utilizadas fueron las adaptadas a microplacas (Racotta & Palacios, 1998; Racotta & Hernández-Herrera, 2000), utilizándose kits comerciales (RANDOX, Sigma-Aldrich, Boehringer Mannheim GMBH) y midiendo la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a diferentes longitudes de onda según fue el caso. En el caso de hemolinfa se determinó la concentración

de proteínas, hemocianina, glucosa, lactato, carotenoides y triglicéridos; para el caso de branquias se cuantificó el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos; en músculo y hepatopáncreas se determinó la concentración de carbohidratos, glucógeno, proteínas, lípidos, triglicéridos, colesterol y carotenoides.

Proteínas Totales

Para determinar las proteínas de las muestras, se utilizó la técnica del Ácido Bicinconínico o BCA (Fijumoto *et al.*, 1985). Se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinconínico, sal sódica para formar un color morado. El color formado es proporcional al contenido proteico de la muestra. Se utiliza una solución reactiva comercial de Sigma (solución de ácido bicinconínico B9643 y solución de sulfato de cobre II C2284). Para el caso de plasma o hemolinfa, se realizó una dilución 1:100 con agua destilada. Para tejidos se usó una alícuota de 0.01 mL del homogeneizado que se pone a digerir en 0.1 mL de NaOH 0.1 N durante 120 minutos, posteriormente se tomó 0.025 mL del digerido o de la muestra diluida, se puso en el fondo de una microplaca y se le agregó el reactivo preparado de BCA. Se incubó a 60°C durante 15 minutos y fue leída su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo Multiskan Spectrum) a 562 nm.

Se utilizó una solución estándar con una concentración de 2 mg/mL de albúmina bovina (Sigma a-3733) para la curva estándar, la cual se diluyó en proporción 1:1 en solución salina obteniendo concentraciones de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, .0625 y 0.03125 mg/mL de proteína y se usó agua destilada como blanco.

La concentración de proteínas se calculó con la siguiente relación:

Proteínas (mg/g) = (Absorbancia x Factor de Dilución) / (pendiente curva tipo x Peso seco del tejido)

Carbohidratos Totales

Para determinar la concentración de carbohidratos totales se utilizó un método basado en Roe *et al.* (1961). Este método se basa en hidrolizar enlaces glucosídicos de los polisacáridos y disacáridos con ácido sulfúrico para convertirlos en monosacáridos, los cuales reaccionan con el compuesto de antrona para dar un color verde, este color varia su intensidad dependiendo de la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra y puede leerse a 620 nm.

Se realizó una curva tipo de la siguiente manera: La solución estándar de carbohidratos fue de dextrosa en una concentración de 5 mg/mL, de la cual se prepararon diluciones en proporción 1:1, en 500 µL de TCA, quedando concentraciones de 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg/mL de carbohidratos. Se utilizó agua destilada como blanco.

La concentración de carbohidratos totales se calculó con la siguiente relación:

Carbohidratos (mg/g) = (Absorbancia x Factor de Dilución) / (Pendiente de la curva tipo x Peso de tejido seco)

Glucógeno

Para la determinación de glucógeno, se tomaron 0.3 mL de homogeneizado de cada muestra y se mezclaron con 0.3 mL de TCA al 20 % en tubos eppendorf, esto con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de

carbohidratos. Los tubos se centrifugaron a 3600 rpm por 10 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Eppendor 5810 R). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios. El glucógeno se determinó por el método de antrona, (Van Handel, 1965), para muestras pequeñas. Para la extracción de glucógeno del sobrenadante de TCA, se tomaron 0.1 mL del sobrenadante de cada muestra, se le añadieron 2 mL de etanol para precipitar el glucógeno. Las muestras se centrifugaron a 3600 rpm y se eliminó todo el etanol, con pipeta y se evaporó en un horno-estufa (VWR-Sheldon Manufacturing 1350FM) a 70 °C, una vez hecho lo anterior se re-suspendió el glucógeno con 0.1 mL de agua destilada. Posteriormente, a cada tubo de muestra y de la curva tipo, se le agregaron 1 mL de solución de antrona 0.1 % diluida en H₂SO₄ al 72 %. Las preparaciones anteriores se calentaron a 90 °C a baño María durante 5 minutos. Por último, se enfriaron, también a baño María, y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 620 nm.

Para obtener la curva tipo, la solución estándar de glucógeno contiene 5 mg mL⁻¹, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500 µL de TCA, quedando concentraciones de 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg mL⁻¹ de glucógeno.

La concentración glucógeno se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Glucógeno (mg/g)} = (\text{Absorbancia} \times \text{Factor de Dilución}) / (\text{Pendiente de la curva tipo} \times \text{Peso de tejido seco})$$

Glucosa

Para medir glucosa, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX método GOD-PAP). El método se basa en la oxidación enzimática de la

glucosa en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar un indicador de quinoneimina dando un colorante rojo violeta (absorbancia máxima a 490 nm) que es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra y que fue calculada a partir de una curva tipo con estándares de 12.5, 5, 50 y 100 mg dL⁻¹. Para los análisis se extrajeron 20 µL de hemolinfa y estándares que se colocaron en el fondo de una microplaca, se le agregó 200 µL de solución reactiva, se incubaron 30 minutos y se leyeron en un lector de microplacas BIO-RAD 550 a una absorbancia de 490 nm.

La concentración de glucosa se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Glucosa (mg/mL)} = (\text{Absorbancia} \times \text{Factor de Dilución} \times 10) / (\text{pendiente de la curva tipo} \times \text{peso de tejido seco})$$

Lactato

Para lactato, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX PAP, No. catalogo LC 2389). El ácido láctico reacciona en presencia de oxígeno y por medio de la reacción catalizadora por la lactato oxidasa se produce piruvato + peróxido de hidrogeno, este último compuesto reacciona con 4-chlorofenol y 4-aminoantipirina en presencia de peroxidasa dando lugar a un compuesto colorido (quinoneimina), el cual es directamente proporcional a la concentración de lactato presente en la muestra y que fue calculada a partir de una curva tipo con estándares de 1.25, 2.5, 10, 20 y 40 mg dL⁻¹.

Para los análisis se extrajeron 20 µL de hemolinfa y estándares que se colocaron en el fondo de una microplaca, se le agregaron 200 µL de solución reactiva, se incubaron 10 minutos y se leyeron en un lector de microplacas BIO-RAD 550 a una absorbancia de 540 nm.

La concentración de lactato se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Lactato (mg/mL)} = (\text{Absorbancia} \times \text{Factor de Dilución}) / (\text{pendiente de la curva tipo} \times \text{peso de tejido seco})$$

Lípidos Totales

Para la cuantificación de lípidos se utilizó el método de la sulfafosfovainillina según Barnes y Balckstock (1973). Este se basa en la reacción de los lípidos con el reactivo fosfovainillina y el ácido sulfúrico para dar un complejo de color rosa. La intensidad de este color es proporcional a la concentración de lípidos en la muestra y es susceptible de leerse a una absorbancia de 540 nm. La curva tipo para lípidos fue una solución estándar de lípidos (Lin-Trol Sigma L2648) con 20 mg/mL, de ésta se prepararán diluciones en proporción 1:1 en 1 mL de solución salina, quedando concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.15625 mg/mL de lípidos. Se utilizó solución salina como blanco.

La concentración de lípidos se calculó con la siguiente relación:

$$\text{Concentración de lípidos (mg/g)} = (\text{Absorbancia} \times \text{Factor de Dilución}) / (\text{pendiente de la curva tipo} \times \text{peso de tejido seco})$$

Triglicéridos

Se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (GPO-PAP kit de RANDOX). Este método se basó en la hidrólisis enzimática con lipasas de los triglicéridos usando un indicador (Jacobs & VanDenmark, 1960, Koditschek & Umbreit, 1969, Trinder, 1969). El indicador es una quinoemina formada por peróxido de hidrógeno, 4-

aminofenazona y 4-clorofenol, bajo la influencia de una peroxidasa, la 4-aminofenazona da un color rosado que puede medirse a 490 nm. Esta coloración es proporcional a la concentración de glicerol-3-fosfato y la concentración absoluta se obtiene al comparar los resultados de las muestras problemas con una curva tipo. Esta técnica ha sido adaptada a microplaca de 96 pozos (Racotta y Palacios, 1998). Se tomó una alícuota del fluido u homogeneizado de 0.020 mL y se puso en el fondo de una microplaca, se le agregaron 0.2 mL de solución reactiva, se incubó 10 minutos y se leyó en un espectrofotómetro de microplacas (Termo Multiskan spectrum) a una absorbancia de 540 nm.

Para la curva tipo, la solución estándar de triglicéridos fue de 200 mg/dL, de ésta, se prepararon diluciones en proporción 1:1, en 1 mL de solución diluyente, quedando concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/dL de triglicéridos. Se utilizó agua destilada como blanco.

La concentración de triglicéridos se calculó con la siguiente relación:

Triglicéridos (mg/g) = (Absorbancia x Factor de Dilución) / (pendiente de la curva tipo x peso de tejido seco)

Colesterol

Esta determinación se realizó utilizando el kit comercial CHOD-PAP (Boehringer Mannheim GMBH, Biberach, Alemania). La técnica se basa en que el colesterol es oxidado enzimáticamente por la colesterol oxidasa (CHOD), entonces el H₂O₂ generada en la oxidación permite la unión oxidativa del fenol con la 4-aminoantipirina mediante una reacción catalizada por la peroxidasa (POD); resulta en una quinoneimina de color rojo como indicador final que puede leerse a 490 nm

con un espectrofotómetro. Se utilizó la técnica adaptada a microplaca de 96 pozos (Racotta y Palacios, 1998), se tomó una alícuota del fluido u homogeneizado de 0.020 mL y se puso en el fondo de una microplaca, se le agregaron 0.2 mL de solución reactiva, se incubó 15 minutos y leyó en un espectrofotómetro de microplacas (Termo Multiskan spectrum) a una absorbancia de 490 nm.

Para este análisis, se elaboró una curva tipo con las siguientes concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg dl⁻¹. Para el blanco se utilizó SIC, el cual es una solución salina isotónica para crustáceos (Mendoza, 1992).

La concentración de colesterol se calculó con la siguiente relación:

Colesterol (mg/g) = (Absorbancia x Factor Dilución) / (pendiente de la curva tipo x peso de tejido seco)

Carotenoides

Para la determinación de carotenoides totales se utilizó la técnica desarrollada por Palacios (*et al.* 1999), que se basa en la propiedad de los carotenoides para ser solubles en grasas ya que pueden ser extraídos con solventes orgánicos (como acetona); y debido a la presencia de un elevado número de enlaces conjugados alternados en su estructura terpenoide el extracto es leído por espectrofotometría a 470 nm (Nachtigall, 2007). Para realizar el análisis se colocó 100 µL del homogeneizado de muestra en tubos de vidrio y se agregó 1 mL de acetona, después los tubos tapados se agitaron y se dejaron 24 horas en la oscuridad. Posteriormente se agregó una espátula de sulfato de sodio anhidro (10 mg) y se agitó, luego se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual fue leído en un espectrofotómetro a 470 nm en celdas de

cuarzo. Se utilizó acetona como blanco y el factor 0.19 como coeficiente de extinción de la absorbancia teórica de una concentración al 1%.

La concertación de carotenoides se calculó con la siguiente relación:

Carotenoides ($\mu\text{g}/\text{gr}$) = (Absorbancia x 10 x factor de dilución) / (0.19 x peso de tejido seco)

EXPRESIÓN

El tejido de branquia preservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue utilizado en el análisis de expresión primero mediante una extracción de ARN para la técnica de microarreglos y después evaluando la expresión de los genes mayormente expresados mediante el análisis de los resultados. La metodología fue la siguiente:

Extracción de ARN

Del tejido conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se utilizó 100 mg de tejido para la extracción de ARN en 1 mL de TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science). La homogenización del tejido se realizó agregando 100 mg de perlas de cristal (SIGMA Glass beads, acid washed, 425 - 600 μm) en el equipo FastPrep®-24. El ARN se resuspendió en agua DEPC 0.1% (el volumen dependió del tamaño del pellet ya sea 15, 30 o 50 μL) y se cuantificó la concentración obtenida en cada extracción utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). La calidad del ARN se evaluó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo condiciones desnaturalizantes.

Diseño experimental de microarreglos

Para garantizar que los análisis mediante microarreglos de ADN fueran confiables, se hizo un diseño especial en el cual se invirtieron los marcadores de las muestras usadas como control usando uno para los retos agudos y otro para los retos crónicos como se describe en la Figura 9.

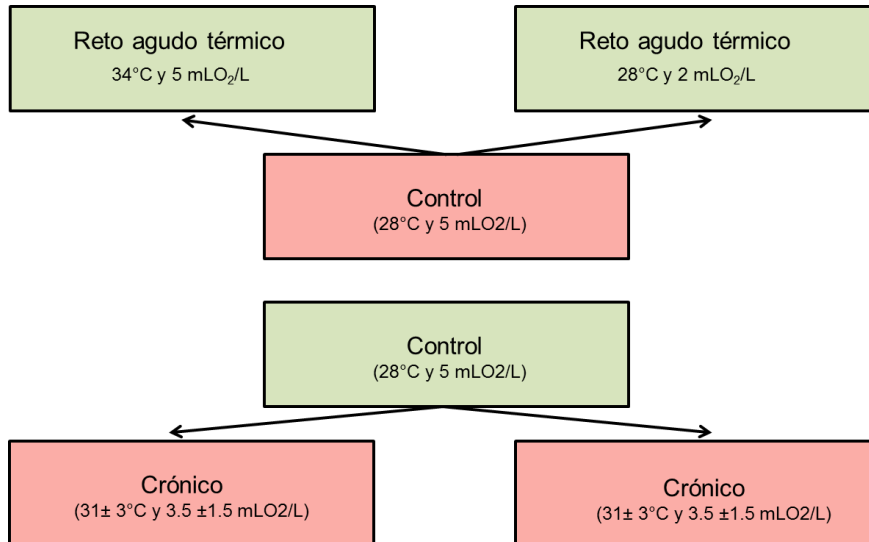


Figura 9. Diseño experimental utilizado para el análisis de expresión de cada reto con el microarreglo heterólogo de *Caenorhabditis elegans*. Los colores representan los marcadores usados en las muestras para contrastar el efecto por los retos.

Hibridación de microarreglo heterólogo

Se realizó una hibridación heteróloga en un microarreglo de ADN de *Caenorhabditis elegans* conformado por 19,593 genes (chip proporcionado por la unidad de microarreglos de la UNAM) para cada uno de los retos (comparándolos con su control), obteniendo 4 hibridaciones: dos para el reto agudo y dos para el crónico, por separado para hipertermia e hipoxia. Una vez que se extrajo el ARN del tejido de branquias preservado a -80 °C de 20 camarones por reto con el protocolo descrito en la sección 6.5.1, para hacer la hibridación en el chip se

realizó un pool con el ARN obtenido de los 20 organismos para cada uno de los retos. El ARN (5 µg) fue retrotranscrito para obtener su ADN complementario con 1 µg de oligo dT y 3 µg de iniciadores aleatorios (random primers) en un volumen final de 20 µL incubados a 70 °C durante 10 min. El ARN fue incubado toda la noche a 25 °C con MgCl₂ (25 mM), dNTPs mix aminoallyl (4 µL), amortiguador 5xChipShot RT (8 µL) y transcriptasa reversa (3.2 µL) del sistema ChipShot indirect labeling and clean-up (Promega, Z4000). Los restos de ARN fueron eliminados con 1 µL de RNAsa H y 0.35 µL de la solución RNase incubando a 37 °C durante 15 min. El ADN complementario con aminoallyl (aa-cADN) fue purificado con la columna del sistema Promega y eluído con 4.5 µL de agua, los cuales fueron evaporados por una hora en un sistema de vacío. Los fluróforos Alexa 555 y Alexa 647 (Life, Technologies, Invitrogen, A32756 y A32757) disueltos en 4.5 µL de DMSO fueron incorporados al aa-cADN durante 60 min. Cada muestra del aa-cADN diluido en 72 µL fue purificada en columnas del sistema Promega y nuevamente eluídos con 100 µL de agua. El aa-cADN fue cuantificado por espectrofotometría en un Nanodrop 2000. El microarreglo fue prehidratado con vapor y fijado al vidrio con dos ciclos de luz UV 0.12 J/cm². Posteriormente se realizó un lavado SDS al 0.1% y dos lavados con agua desionizada. Los arreglos fueron prehibridizados (SSC 5X, SDS 0.1%, BSA 1%) durante 1 h a 42 °C continuando con 5 lavados con agua desionizada y secados por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Los aa-cADN resuspendidos con solución de hibridación (SSC 20X, SDS 1%, TE EN 70µL) fueron mezclados y desnaturalizados a 94 °C por 5 min y a 65 °C durante 30 s. Las mezclas fueron aplicadas sobre los microarreglos y posteriormente el chip se cubrió con un cubreobjetos (HybridSlip Schleicher and Schuell) y fue colocado en una cámara de hibridación durante 12 h a 42 °C. Los arreglos fueron enjuagados un par de veces en 50 mL de SSC 1X SDS 0.05%, seguidos de 4 lavados con SSC 0.06X y el exceso se retiró por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min.

Análisis de microarreglos

El análisis de los microarreglos se realizó en el escáner de lectura confocal ScanArray 4000 Packard Biochips. La imagen escaneada fue analizada con una rejilla que delimita cada punto utilizando el programa GenPix-Pro7 (Molecular Devices). Para cada punto se determinó la media de las densidades de las fluorescencias de Alexa 555 y Alexa 647, así como la media del ruido de fondo y la normalización de los canales calculados con el programa ArrayPro Analyser (Molecular Devices). El análisis de los microarreglos fue realizado con el programa GenArise, desarrollado en la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, realizando las transformaciones, correcciones del ruido de fondo, normalización, filtrado de la intensidad, análisis de replicas y expresión diferencial de genes, el programa calculó la desviación estándar respecto a la media de cada punto para definir el Z-score:

$$Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / Sd(R)$$

Donde:

Z_i: Z-score para cada punto.

R_i: Log-radio de cada punto.

Sd (R): desviación estándar del Log-radio.

Bajo este criterio, tanto los genes sobre-expresados como los reprimidos con Zscore>1.5 fueron considerados como genes expresados diferencialmente entre condiciones, tomándolos para su posterior análisis. Una vez obtenidos los genes con valores de Z-score mayor a 1.5, se obtuvieron los números de identificación de cada uno de ellos y se realizó la anotación ontológica de cada gen utilizando el programa en línea DAVID (<http://david.niaid.nih.gov>) para obtener los diferentes procesos biológicos en los que están involucrados y las rutas metabólicas modificadas para cada uno de los tratamientos.

ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

A los valores obtenidos se les realizó un análisis de Kolmogorov-Smirnov para corroborar que las muestras tuvieron una distribución normal, en caso de no ser así fueron normalizadas mediante los métodos de log10 o ARCSEN. Posteriormente se realizó un análisis para certificar que sus varianzas fueran homogéneas mediante la prueba de Cochran al 95% de significancia. Después se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de las variables ambientales (temperatura y oxígeno), sobre los cambios de estas sustancias en los diferentes tejidos. Este efecto fue evaluado tanto en la respuesta aguda como la crónica y también comparado con el control. Para aquellos tratamientos donde se presentaron diferencias significativas, se aplicó una prueba a posteriori de Tukey al 95% de confianza para identificar los tratamientos diferentes. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA (versión 7).

RESULTADOS

BIOENSAYOS

Exposición a cambio agudo de temperatura

La Figura 10, muestra las condiciones reales de temperatura mantenidas durante el reto agudo. Durante la fase experimental no se observaron variaciones mayores a ± 0.5 °C en relación a la temperatura programada.

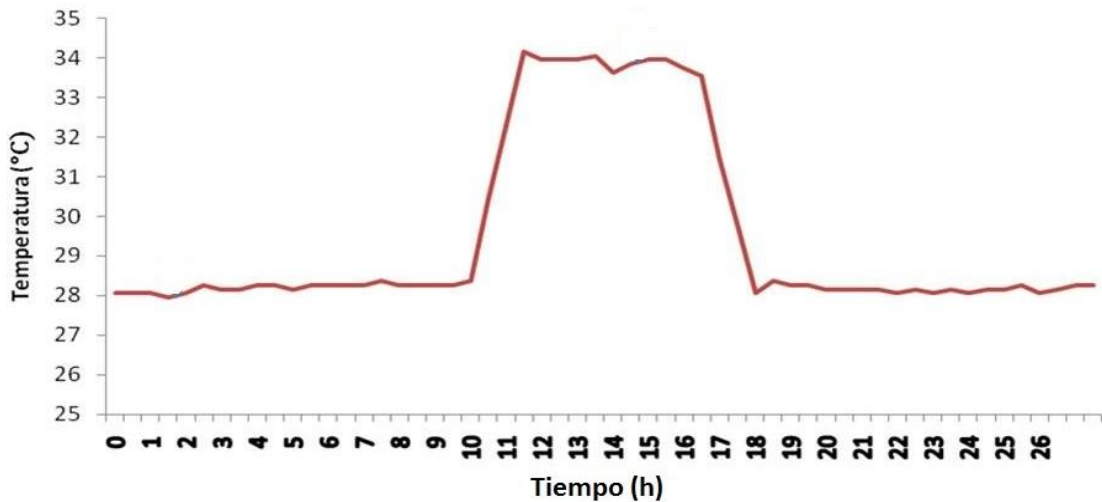


Figura 10. Registro de temperatura al que fueron expuestos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, durante el cambio agudo.

Exposición a cambio agudo de oxígeno

En la Figura 11 se observan los cambios reales de la concentración de oxígeno disuelto logrados durante el reto agudo.

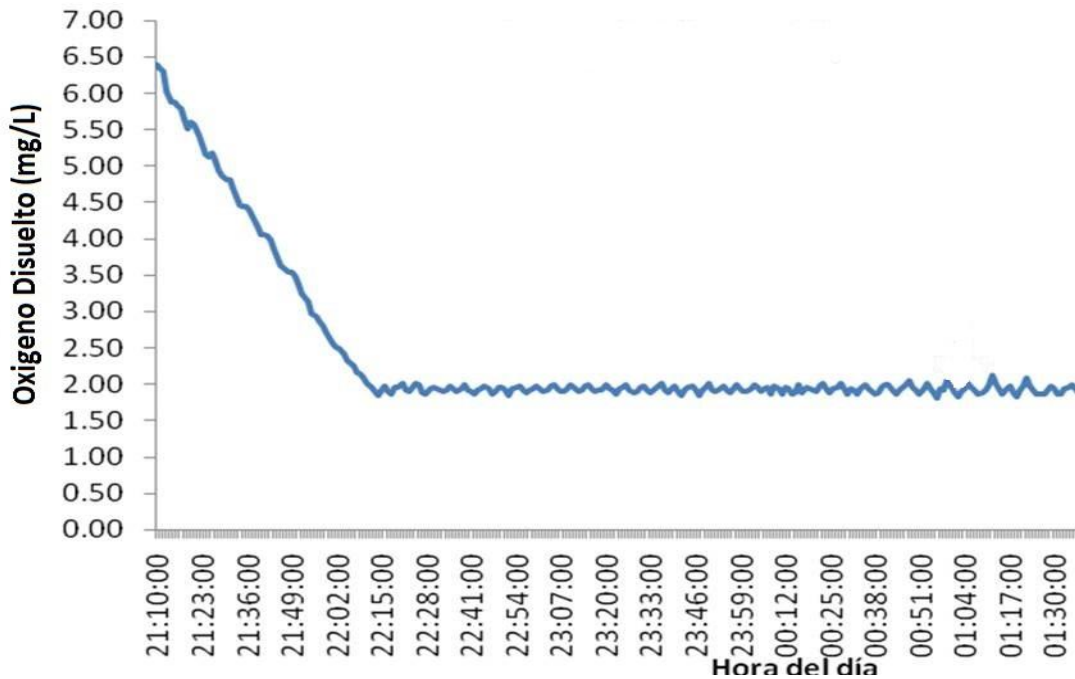


Figura 11. Registro de oxígeno disuelto al que fueron expuestos los juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) de 11 g de peso, durante el cambio agudo.

Exposición a cambio crónico de temperatura y oxígeno

El registro de los cambios oscilantes de temperatura 31 ± 3 °C y oxígeno disuelto 3.5 ± 1.5 mgO₂/L para lograr la exposición al cambio crónico se observan en la Figura 12. Se logró exponer a los organismos durante un periodo de 28 días a las variaciones programadas y aunque se presentaron algunas fallas de control en el sistema, éstas fueron restablecidas en tiempos razonables y no se observó mortalidad durante estos periodos. Las mediciones y toma de muestras se realizaron al final del bioensayo y los resultados fueron contrastados con un control mantenido a temperatura y oxígeno óptimos de 28 ° C y 5 mgO₂/L por un lado y con los resultados del efecto agudo.

Temperatura y Oxígeno Disuelto Oscilante

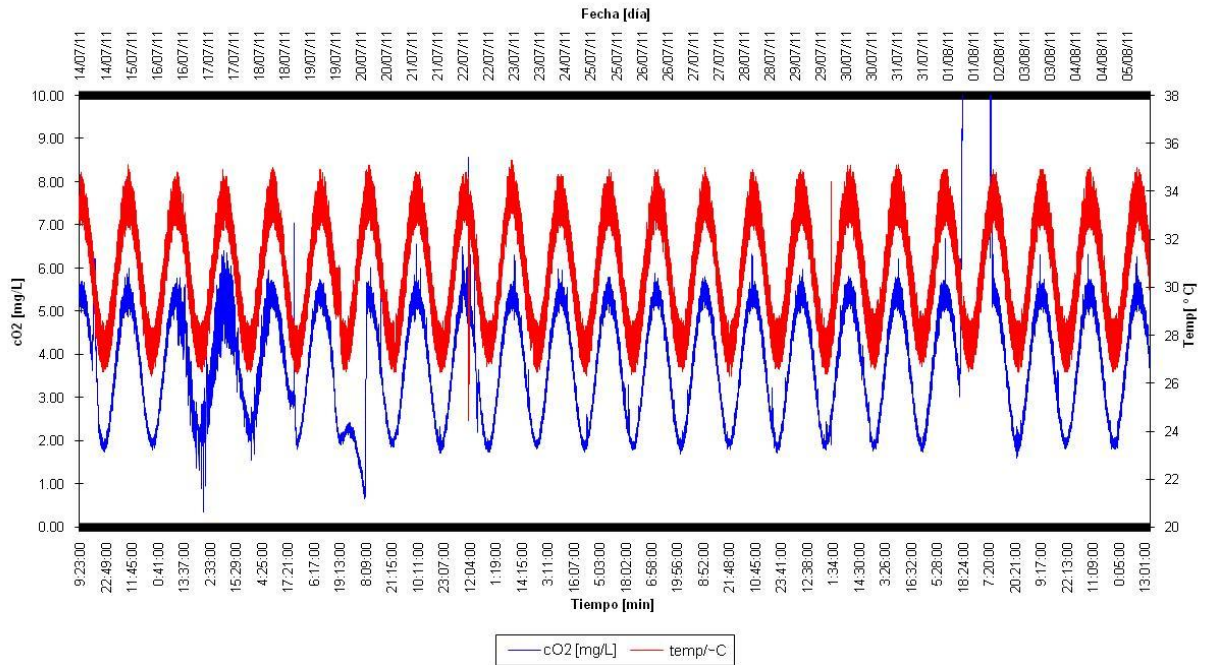


Figura 12. Registro de las oscilaciones térmicas y de oxígeno disuelto a las que fueron expuestos organismos juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) de 11 g de peso, para evaluar la respuesta crónica a 28 días.

TEJIDOS OBTENIDOS

La Tabla I resume el total de muestras de tejidos obtenidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) para todos los bioensayos realizados. Aunque idealmente se pensó determinar todas las biomoléculas para todos los tejidos muestreados, en algunas ocasiones no fue posible, debido a que la cantidad de tejido no era suficiente. En el caso de hemolinfa sólo se determinó la concentración de proteínas y triglicéridos; mientras que para el caso de branquias se cuantificó contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos; en músculo y hepatopáncreas se determinó la concentración de carbohidratos, proteínas, lípidos y triglicéridos, realizándose un total de 780 análisis.

Tabla I. Muestras de tejido obtenidas para análisis bioquímicos procedentes de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) expuestos a diferentes condiciones de temperatura y oxígeno disuelto, tanto en los retos agudos como crónicos.

Bioensayo	Condición	# Organismos muestreados	Tejidos obtenidos *
Control reto agudo	28°C y 5 mgO ₂ /L	12	HP, HM, MUS, BRA
Agudo temperatura	34°C y 5 mgO ₂ /L	12	HP, HM, MUS, BRA
Agudo oxígeno	28°C y 2 mgO ₂ /L	12	HP, HM, MUS, BRA
Crónico temperatura	31 ± 3°C y 3.5 ± 1.5 mgO ₂ /L	12	HP, HM, MUS, BRA
Crónico oxígeno	31 ± 3°C y 3.5 ± 1.5 mgO ₂ /L	12	HP, HM, MUS, BRA
Total		60	240

* HP= Hepatopáncreas, HM= hemolinfa, MUS= músculo, BRA= branquias.

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS

En esta sección se presentan los resultados de las tasas fisiológicas de ingestión, respiración y excreción; así como la eficiencia de absorción y la tasa de absorción a partir de las cuales se calculó el potencial de crecimiento de los organismos bajo los diferentes retos y tiempos experimentales. Las diferencias marcadas como significativas fueron aquellas que cumplieron con el 95% de confianza.

Tasas Fisiológicas

Tasa de ingestión

La tasa de ingestión (TI) en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) expuestos a un reto agudo térmico se muestran en la Figura 13. Los camarones presentaron

una TI significativamente menor durante su exposición al reto agudo de temperatura respecto a lo reportado al inicio y en la etapa de recuperación se observó una tendencia a subir a niveles iniciales, sin embargo las diferencias no fueron significativas en relación al periodo de hipertermia. Los resultados de TI obtenidos debido al reto agudo de hipoxia se muestran en la Figura 14. Al igual que en el reto por temperatura, se observó que los organismos disminuyeron su TI significativamente durante la hipoxia respecto a lo reportado al inicio. Durante la recuperación los organismos incrementaron su TI hasta establecer valores normales en relación a los valores iniciales. Durante el reto crónico se observó un incremento de la TI durante la exposición a hipertermia y una disminución durante la hipoxia. Sin embargo, los valores no mostraron diferencias significativas a excepción del día 14 donde se presentó un aumento de más del 100% de la ingestión comparado con los otros días (Figura 15).

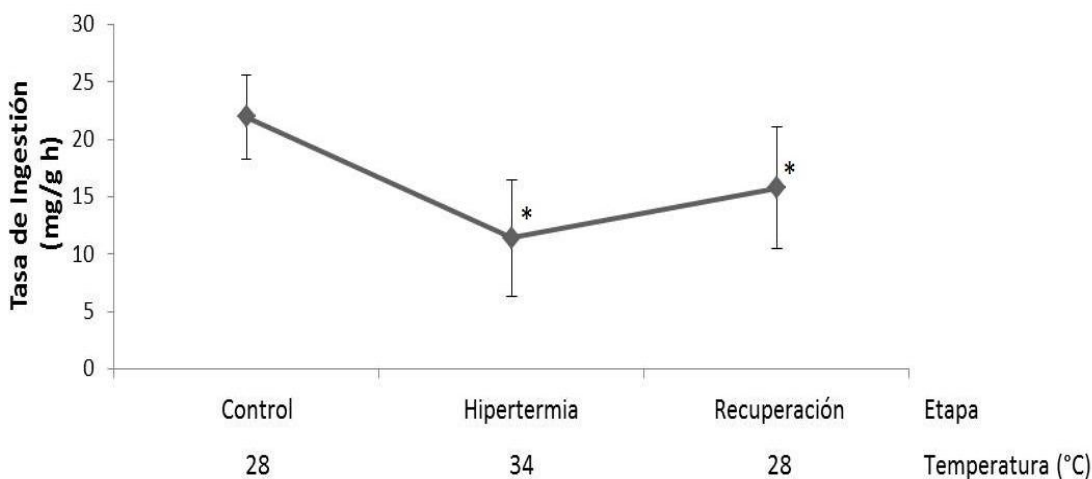


Figura 13. Tasa de ingestión ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

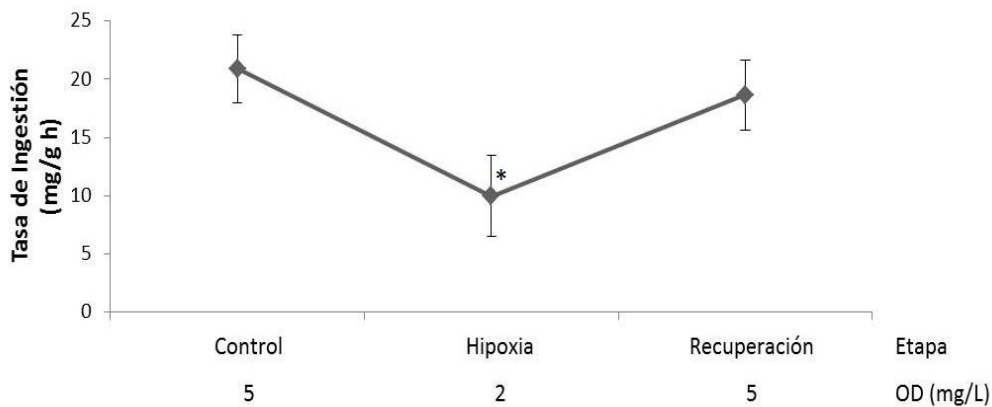


Figura 14. Tasa de ingestión ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

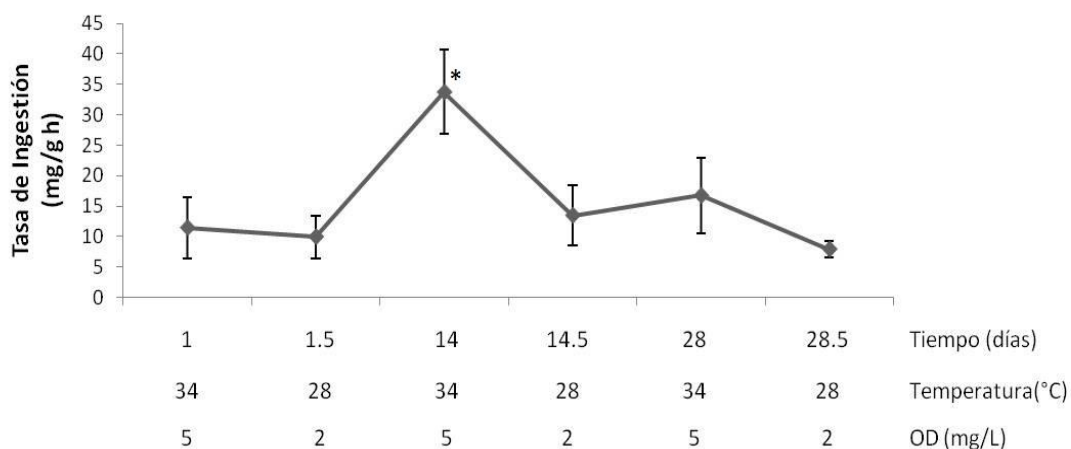


Figura 15. Tasa de ingestión ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

Tasa respiratoria

La tasa respiratoria (TR) no presentó modificaciones significativas durante su exposición al reto agudo de temperatura respecto a lo encontrado en el grupo control (Figura 16). Sin embargo en relación al reto de hipoxia los camarones observaron TR disminuidas (Figura 17) con diferencias significativas respecto al inicio. Otra observación importante es que los organismos presentaron durante la

recuperación una compensación total de esta tasa. Por otra parte, durante el reto crónico la TR presentó incrementos en las condiciones de temperaturas altas (34°C) y normoxia (5mgO₂/L), y disminuciones durante la temperatura de 28°C e hipoxia (2mgO₂/L). Se observaron diferencias significativas de la TR de los días 14 y 28 respecto al primer día (Figura 18).

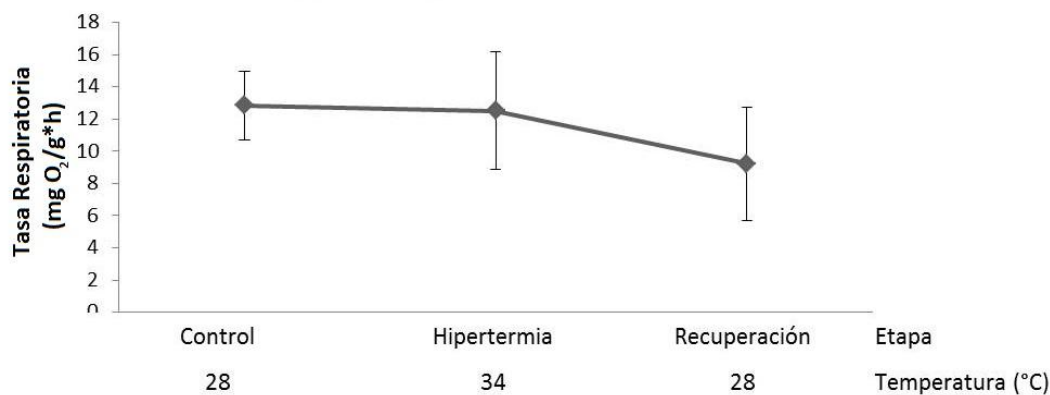


Figura 16. Tasa respiratoria ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

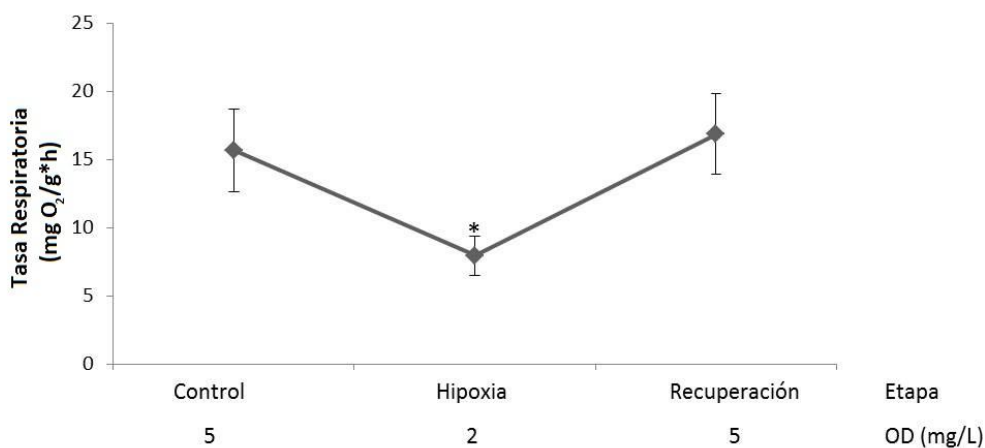


Figura 17. Tasa respiratoria ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

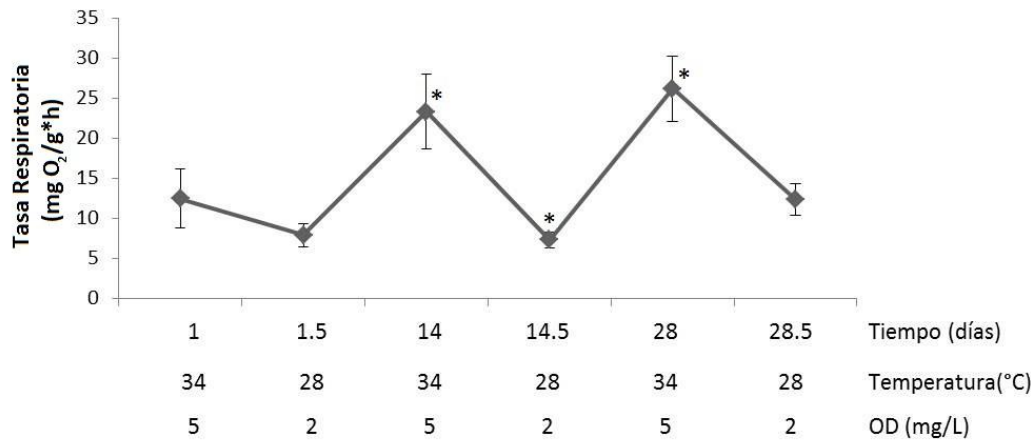


Figura 18. Tasa respiratoria ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$).

Tasa de excreción de amonio

La tasa de excreción (TE), no mostró diferencias significativas durante la exposición a hipertermia con respecto al control, sin embargo durante la recuperación los organismos mostraron un decremento de excreción significativamente distinto (Figura 19). Durante la exposición a hipoxia se presentó un incremento de TE en relación al control aunque las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, en la etapa de recuperación la TE se incrementó significativamente en relación a los demás valores (Figura 20). Para el reto crónico, la TE mostró una tendencia a incrementarse en el tiempo, sin embargo solo mostró un aumento con diferencias significativas respecto al primer día para el último día durante la exposición a hipoxia (Figura 21).

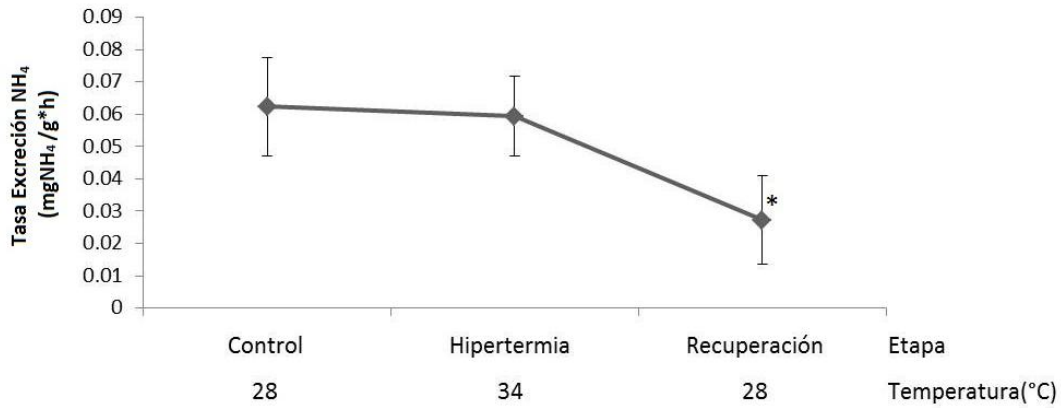


Figura 19. Tasa de excreción ($\bar{x} \pm ds$), de amonio de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

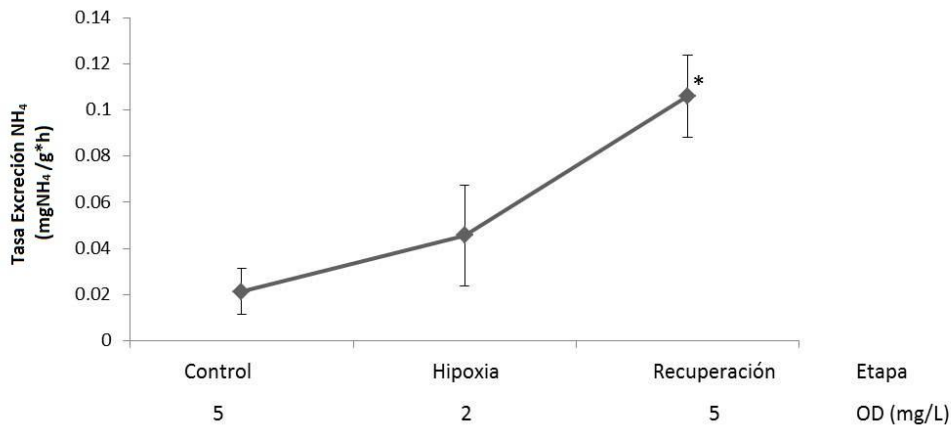


Figura 20. Tasa de excreción ($\bar{x} \pm ds$), de amonio de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

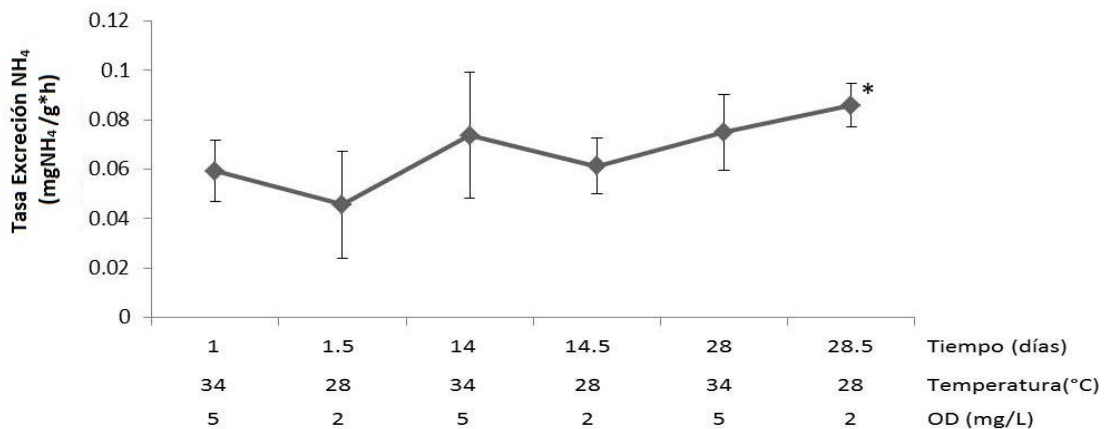


Figura 21. Tasa de excreción ($\bar{x} \pm ds$), de amonio de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a 3.5 ± 1.5 mgO₂/L por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

Eficiencia de absorción

Durante los retos agudos de temperatura e hipoxia, la eficiencia de absorción (EA) no tuvo cambios (Figura 22 y 23). Sin embargo, durante la exposición crónica, se observó una disminución estadísticamente significativa para el día 14 y el 28, en relación al inicio (Figura 24).

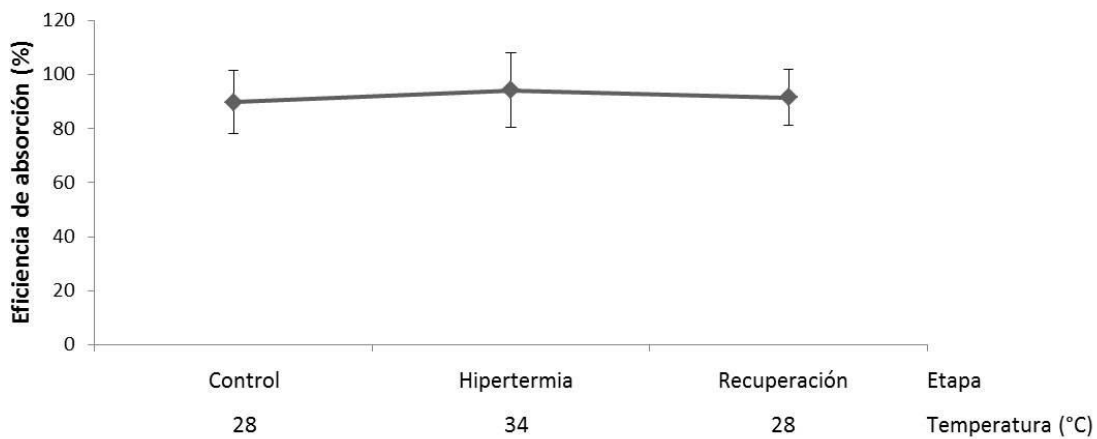


Figura 22. Eficiencia de absorción ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

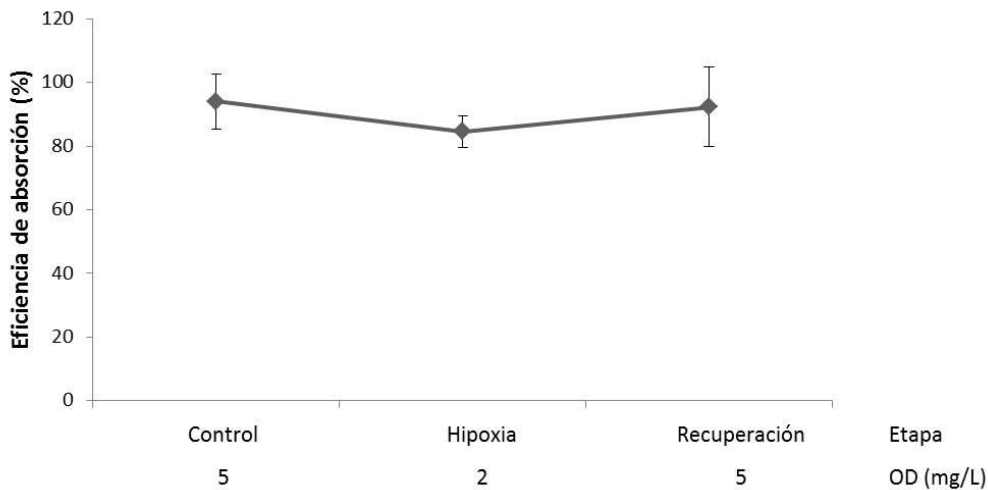


Figura 23. Eficiencia de absorción ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

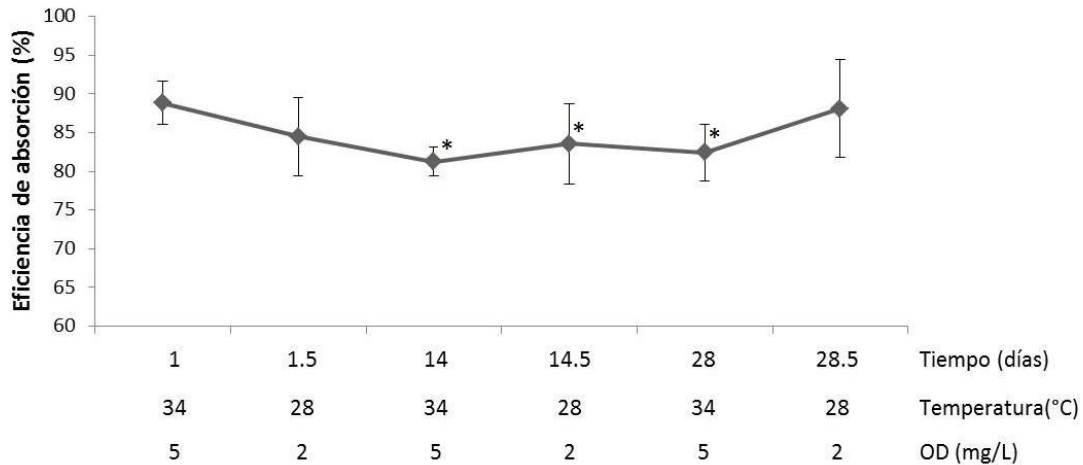


Figura 24. Eficiencia de absorción ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$).

Potencial de crecimiento

Los cambios observados en el potencial de crecimiento (PC) en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) expuestos al reto agudo de hipertermia se muestran en la Figura 25. Se observó un aumento del PC durante cada etapa del bioensayo, pero solo fue significativo durante la etapa de recuperación con respecto al control. En el reto agudo de hipoxia, no se modificó el PC a lo largo de todo el bioensayo (Figura 26). En el caso del reto crónico (Figura 27) se observa una relación inversa a la temperatura con diferencias significativas para el día 14 y 28 durante la hipertermia respecto a las demás mediciones.

Pigmento respiratorio (hemocianina)

El contenido de hemocianina (Hc) en la hemolinfa de juveniles de camarón blanco expuestos tanto a los retos agudos como al crónico se muestra en las Figuras 28, 29 y 30. En el reto agudo de temperatura no se observaron cambios, para el reto agudo hipoxia se observó una disminución significativa de la Hc respecto al control

desde las 0.5 h, regresando a valores iniciales a las 4 h y disminuyendo nuevamente a las 12 h y 24 h con valores significativamente distintos respecto al control. En el caso del reto crónico se observó un aumento sostenido durante todo el reto, los valores fueron significativamente distintos a partir del día 14.5.

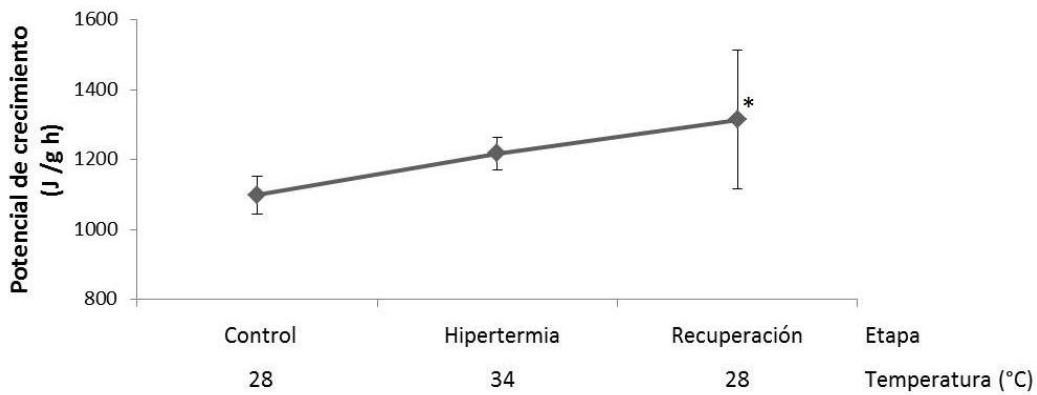


Figura 25. Potencial de crecimiento ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

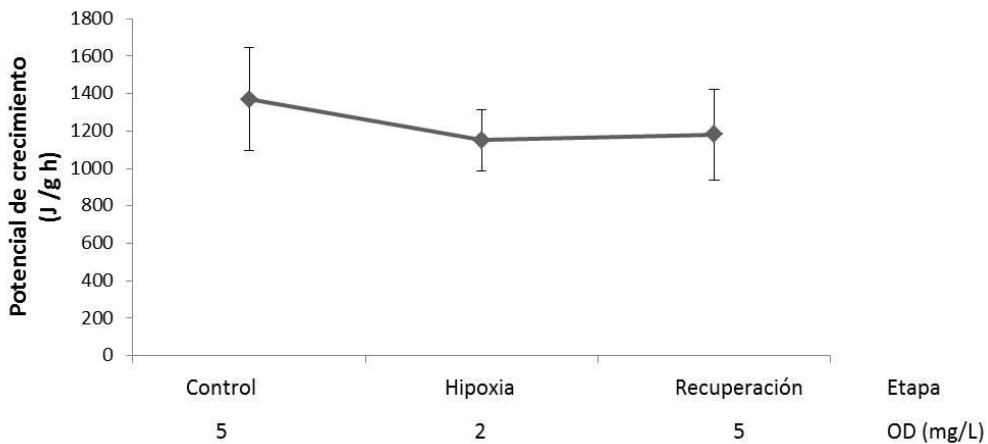


Figura 26. Potencial de crecimiento ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

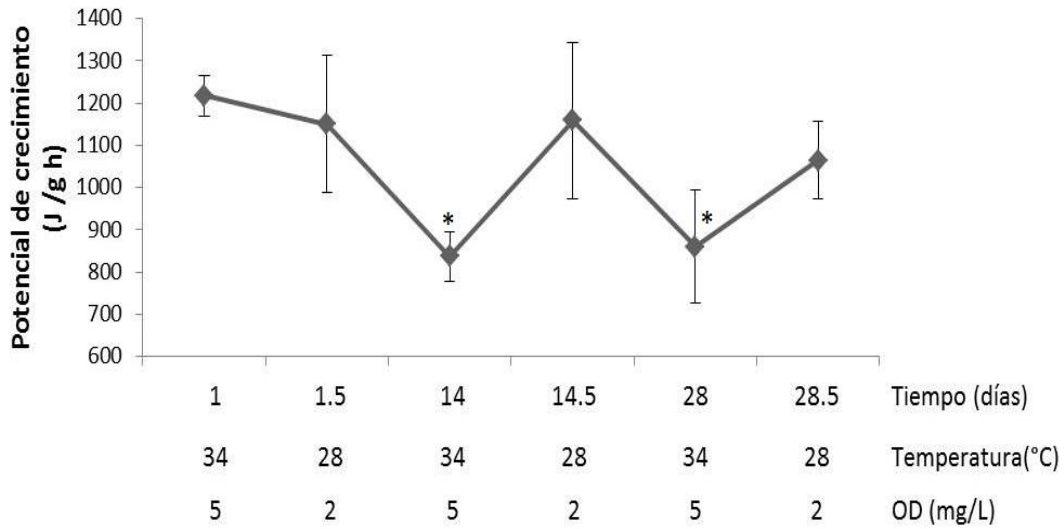


Figura 27. Potencial de crecimiento ($\bar{x} \pm ds$), de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$).

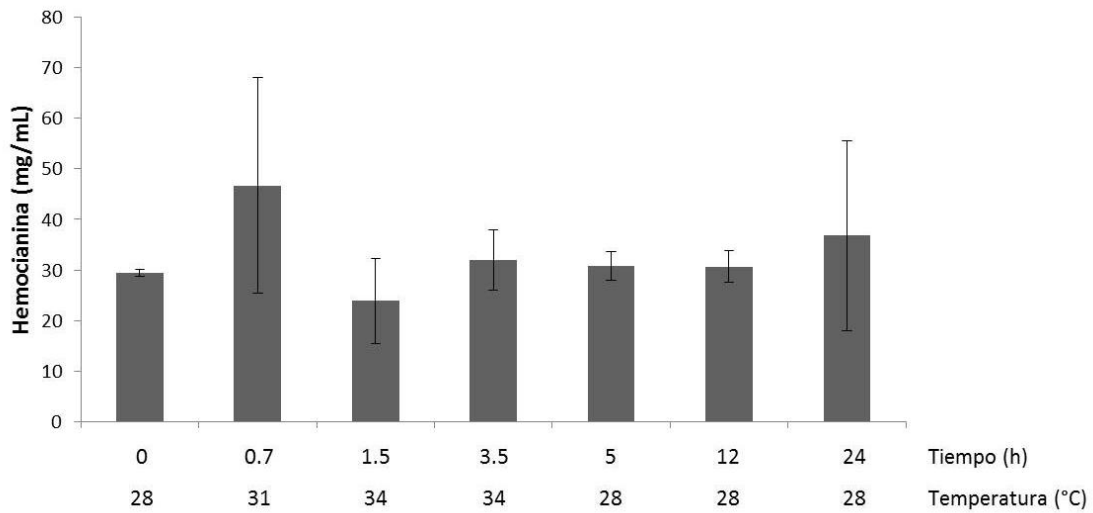


Figura 28. Contenido de hemocianina ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$).

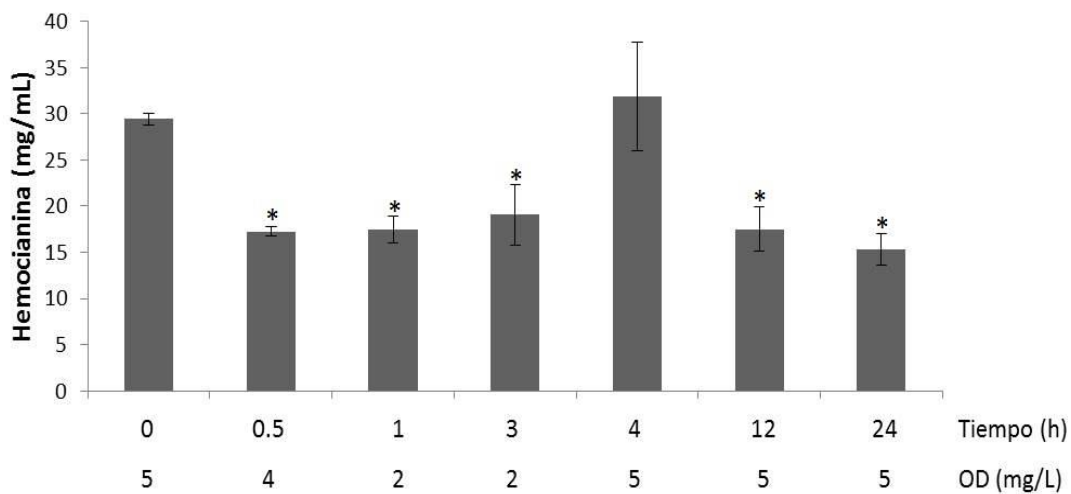


Figura 29. Contenido de hemocianina ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

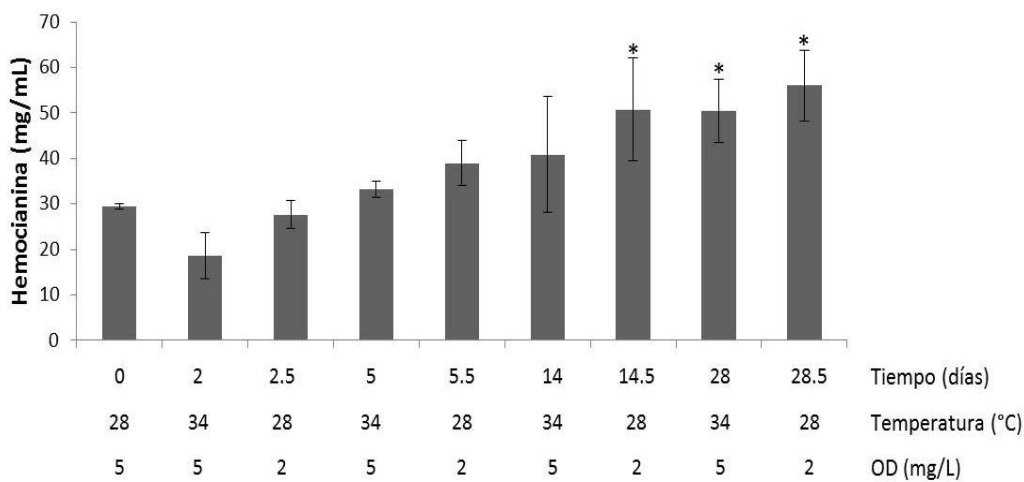


Figura 30. Contenido de hemocianina ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

CONTENIDO BIOQUÍMICO

Proteínas

El contenido de proteínas totales (Pt) para los distintos tejidos del camarón blanco expuestos a los retos agudos y crónico se muestran en las Figuras 31, 32 y 33. En músculo y las branquias no se observan diferencias de las Pt con respecto al control en exposiciones agudas, sin embargo en el reto crónico, en el músculo se observa una disminución a los 5.5 días y en el caso de las branquias solo hay un aumento al día 14. En el caso del hepatopáncreas las Pt disminuyeron en el reto agudo de temperatura respecto al control teniendo su mínimo a las 3.5 h y observando el regreso a valores normales de las 12 h en adelante. En el reto de hipoxia se observó que las Pt disminuyeron desde las 0.5 h hasta las 12 h y después aumentando más que las condiciones iniciales a las 24 h. En el caso del reto crónico se observó una disminución de las Pt que va prolongándose durante el tiempo llegando a su mínimo al final del experimento (28.5 días). En hemolinfa en el reto agudo de temperatura, se observó una disminución de las Pt a las 1.5 h respecto al control, regresando a valores normales para las 3.5 h. Para el reto agudo de hipoxia las Pt en la hemolinfa disminuyeron durante todo el experimento hasta su término (24h), mostrando valores significativamente distintos respecto al control en este tiempo. Durante el reto crónico las Pt disminuyeron el día 2.5 y posteriormente se incrementaron paulatinamente hasta el día 14.5. Posterior a este día para el día 28.5 se restablecieron a valores normales respecto al control.

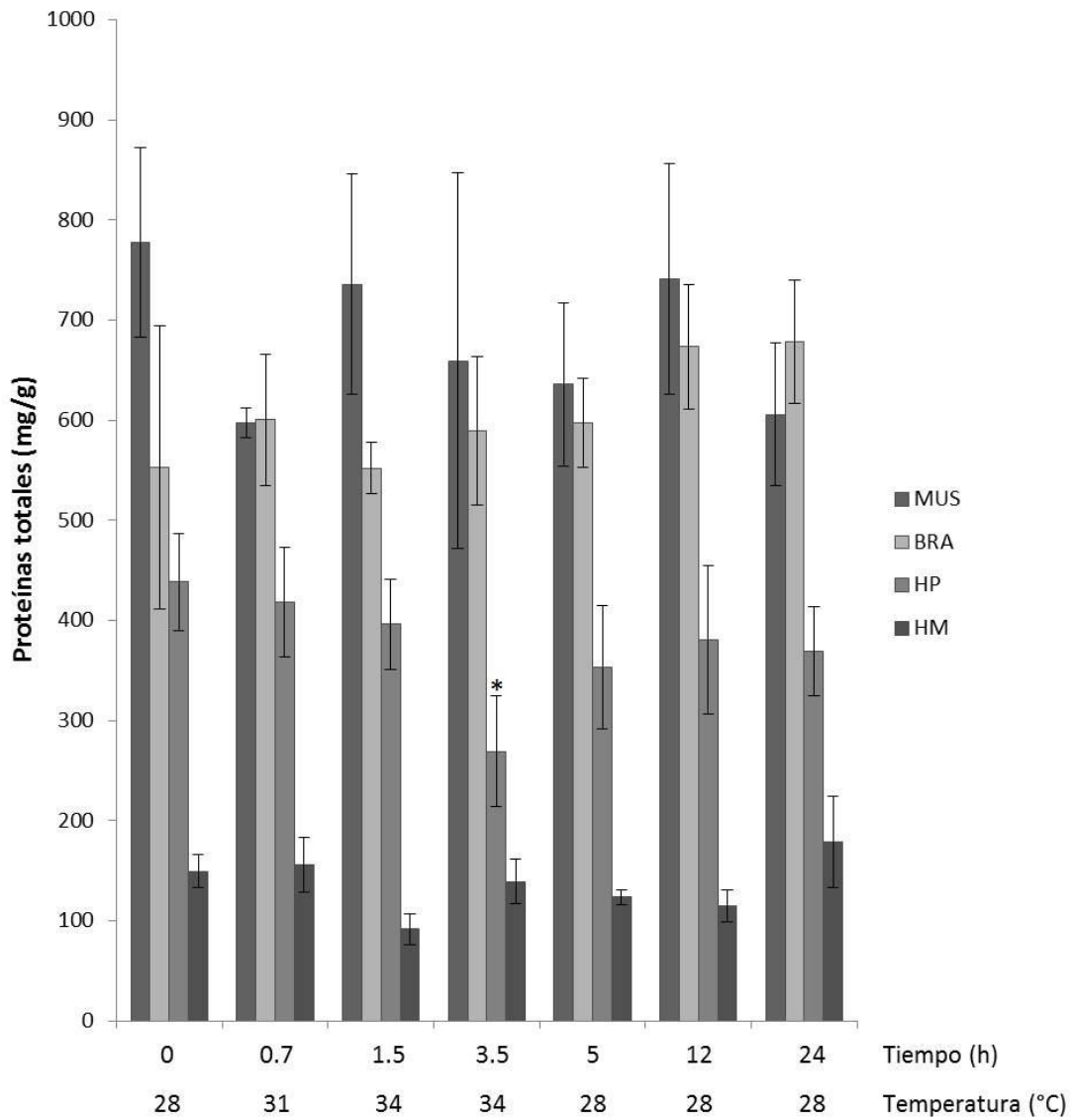


Figura 31. Contenido de proteínas totales ($\bar{x} \pm ds$), en cuatro tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

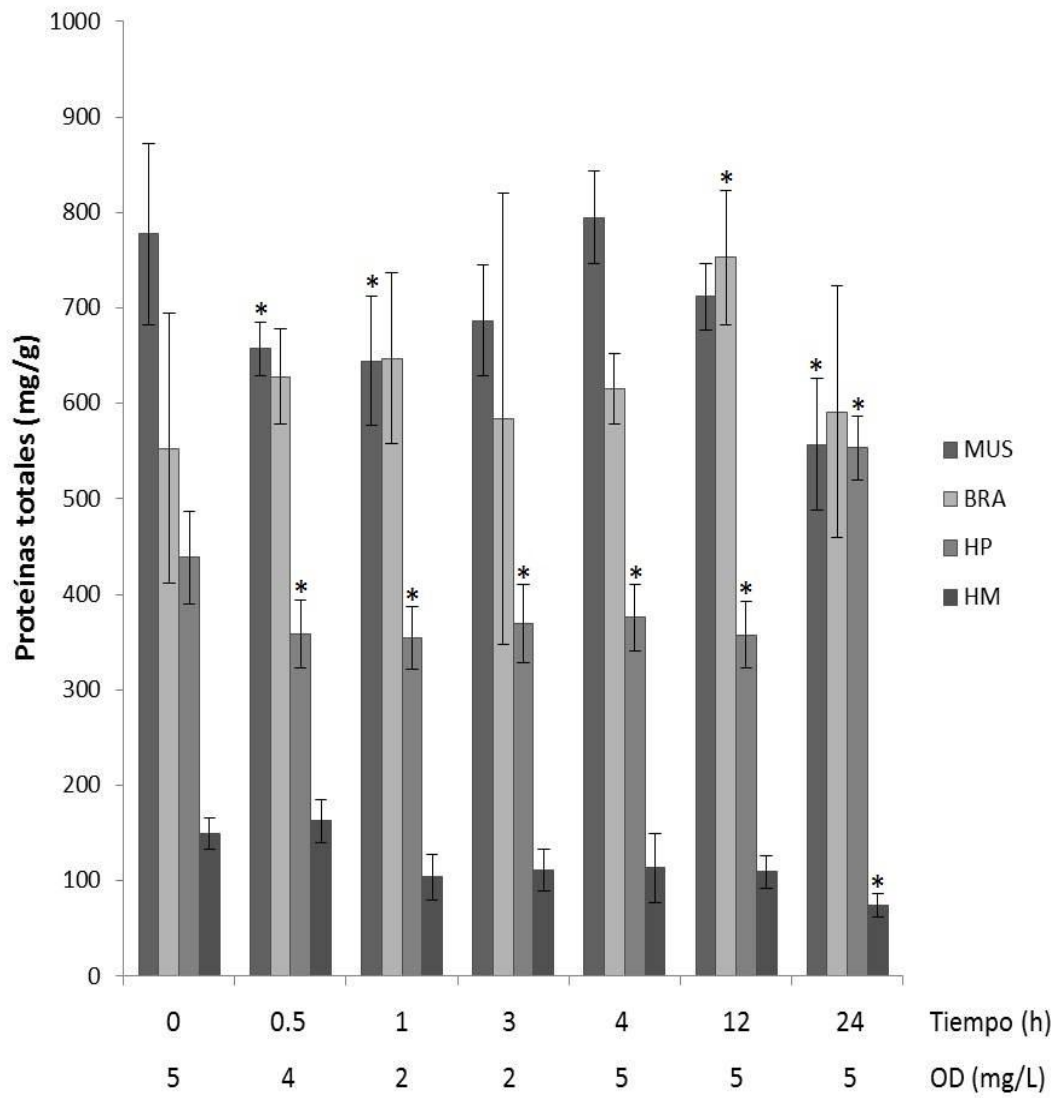


Figura 32. Contenido de proteínas totales ($\bar{x} \pm ds$), en cuatro tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

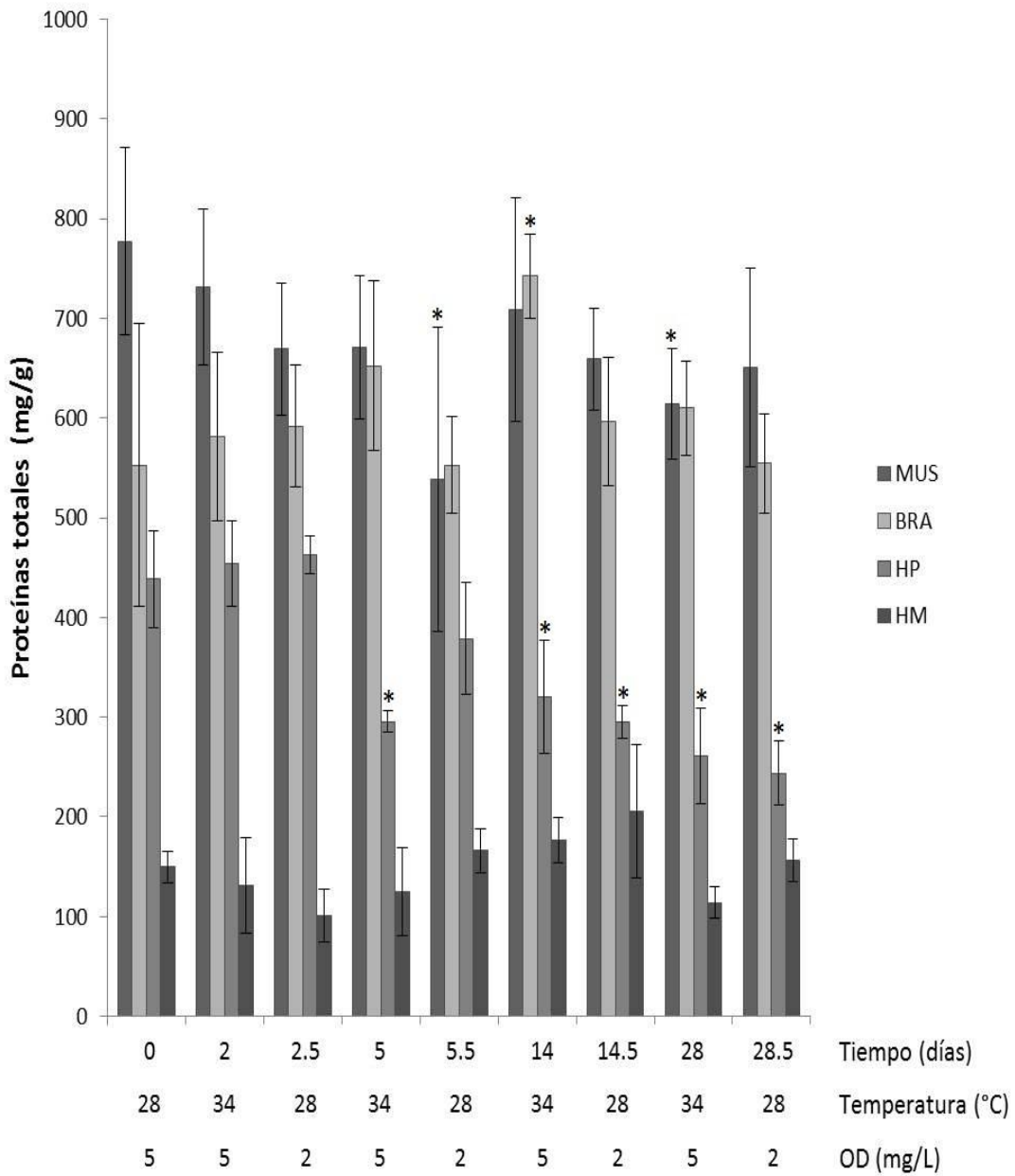


Figura 33. Contenido de proteínas totales ($\bar{x} \pm ds$), en cuatro tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$). BR=Branquias HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

Carbohidratos

El contenido de carbohidratos totales (Chos) en el músculo, branquias y hepatopáncreas de juveniles de camarón blanco expuestos a los retos agudos de temperatura y oxígeno y al reto crónico de ambas variables se muestran en las Figuras 34, 35 y 36. En la branquia los Chos se incrementaron significativamente respecto al control tanto en el reto agudo de temperatura (3.5 h), como en el de hipoxia (3 h) con una recuperación hacia las 24 h. Durante el reto sostenido a ambas variables se observó un incremento muy alto con diferencias significativas del contenido de estas moléculas en relación a los valores normales. En músculo los Chos aumentaron significativamente en ambos retos agudos con respecto al control, observando una respuesta más rápida en el reto de hipoxia (0.5 h), que en el de temperatura (3.5 h) y se observó una recuperación a las 24 h en ambos retos. Durante la respuesta crónica se observaron valores significativamente más altos que los valores observados para el control. De manera contraria a lo observado en músculo y branquias, en hepatopáncreas los Chos disminuyeron sin observarse recuperación con respecto al control tanto en los retos agudos. Este comportamiento se observó más claramente en el experimento crónico, donde los Chos disminuyeron a partir del día 2 y no se observó recuperación.

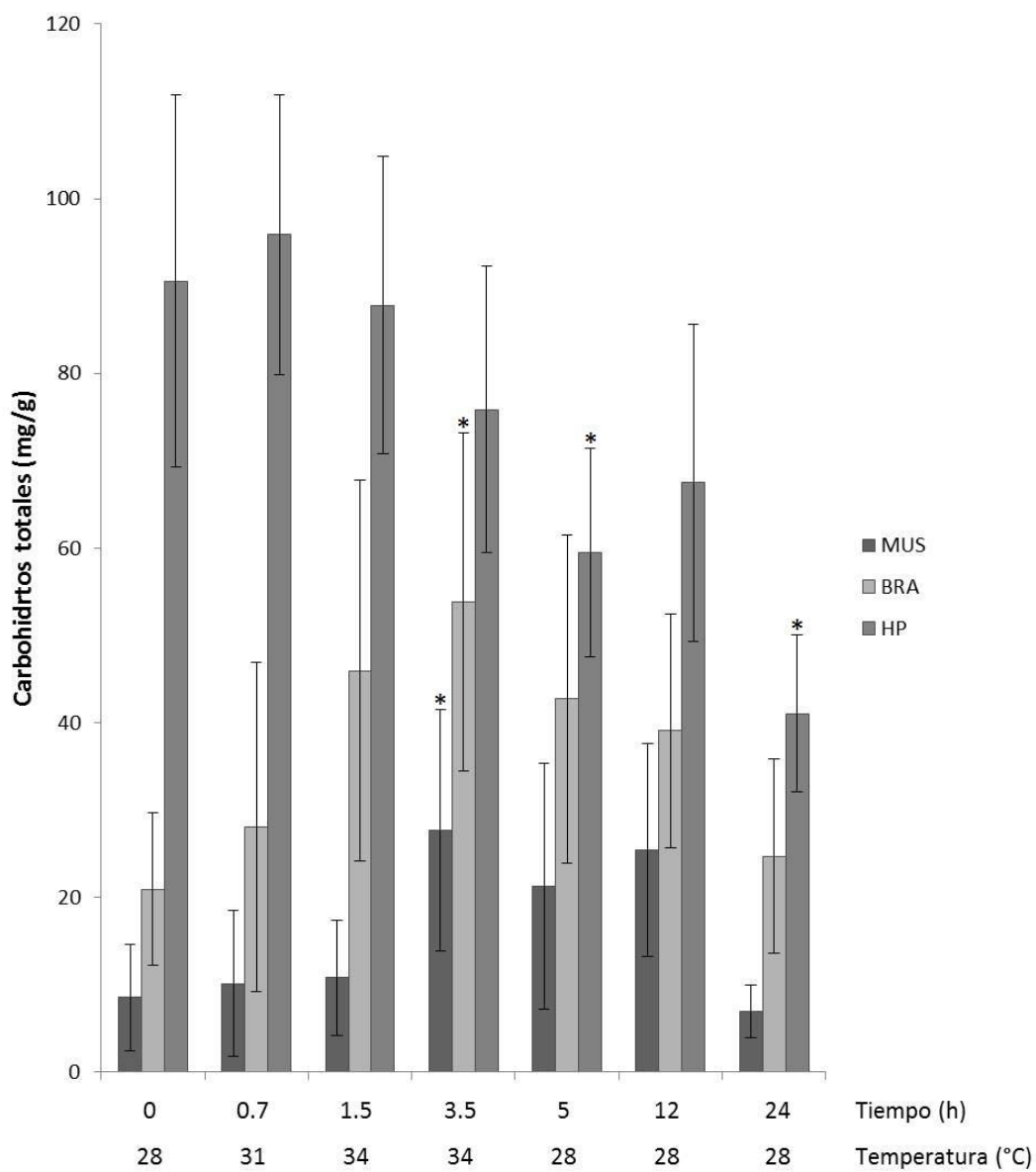


Figura 34. Contenido de carbohidratos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

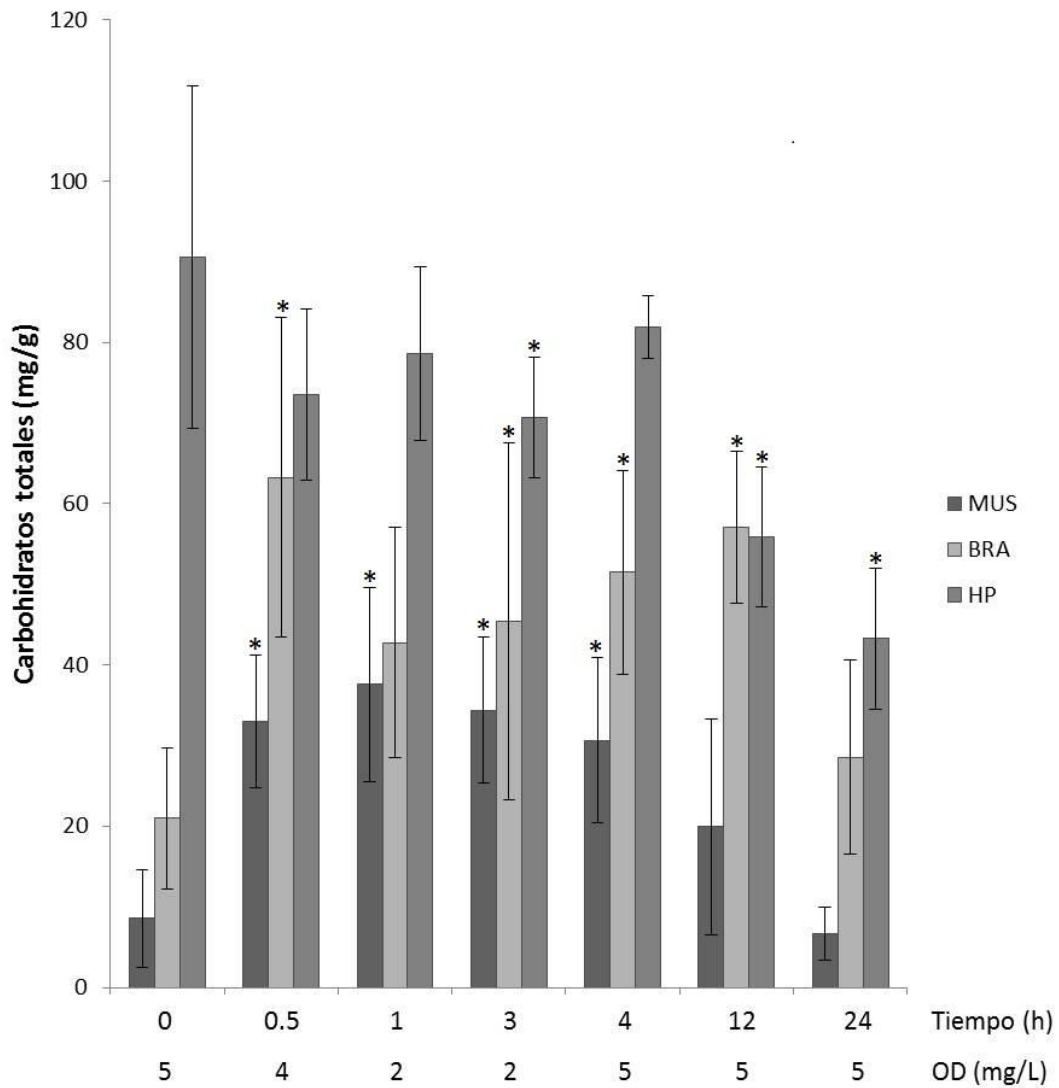


Figura 35. Contenido de carbohidratos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

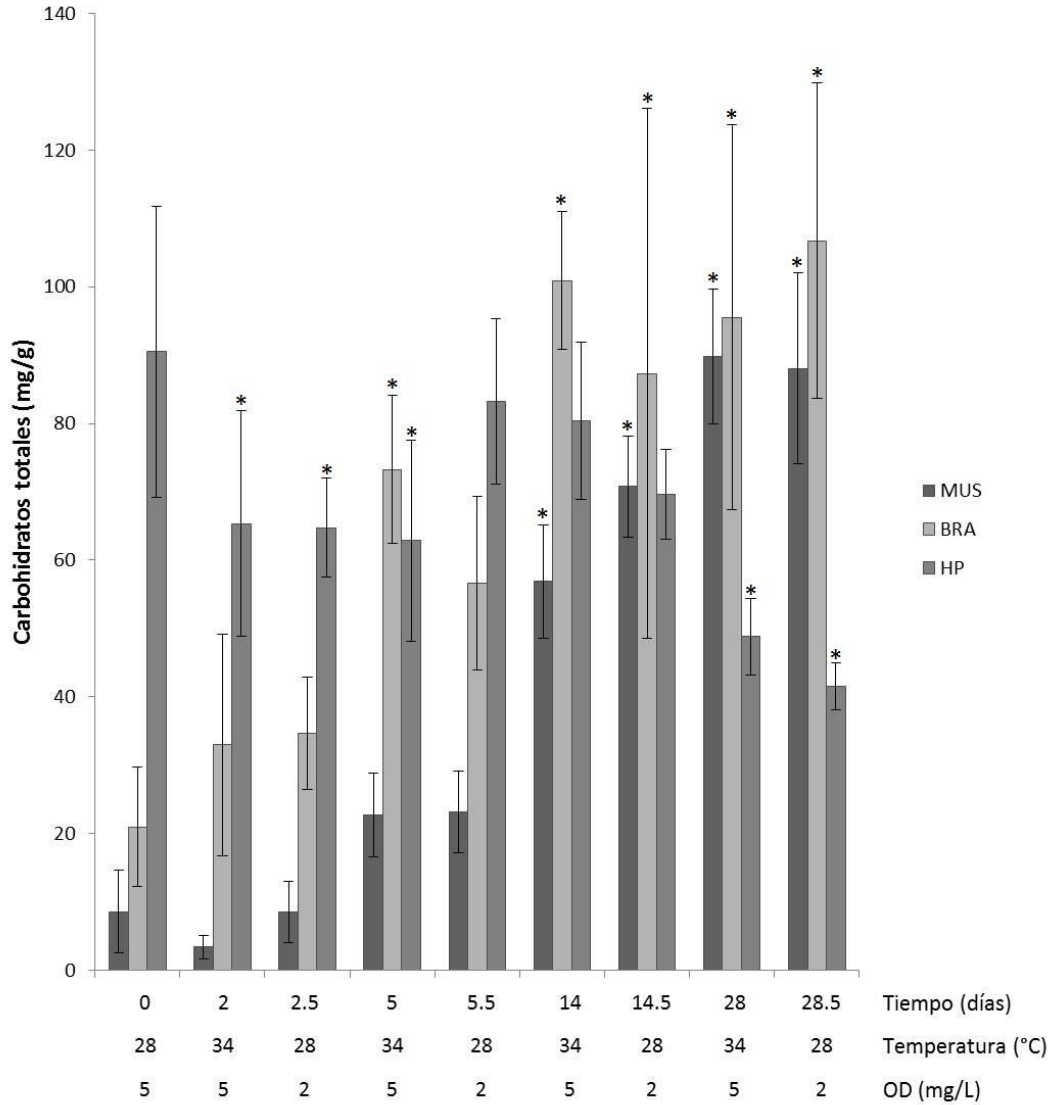


Figura 36. Contenido de carbohidratos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

Glucógeno

El contenido de glucógeno (Gc) en el músculo y hepatopáncreas de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos a los retos agudos y al reto crónico se muestran en las Figuras 37, 38 y 39. En músculo en los retos agudos no se observan diferencias del contenido de Gc respecto al control, sin embargo en el reto crónico el Gc se empieza a almacenar mayormente del día 14.5 en adelante. En el hepatopáncreas para la respuesta aguda, este compuesto disminuyó, tanto para el reto agudo de temperatura (3.5 h), como para el de hipoxia (3 h) y no se observó recuperación. En la respuesta crónica, se observó una pérdida paulatina del Gc conforme se prolonga la exposición prolongada.

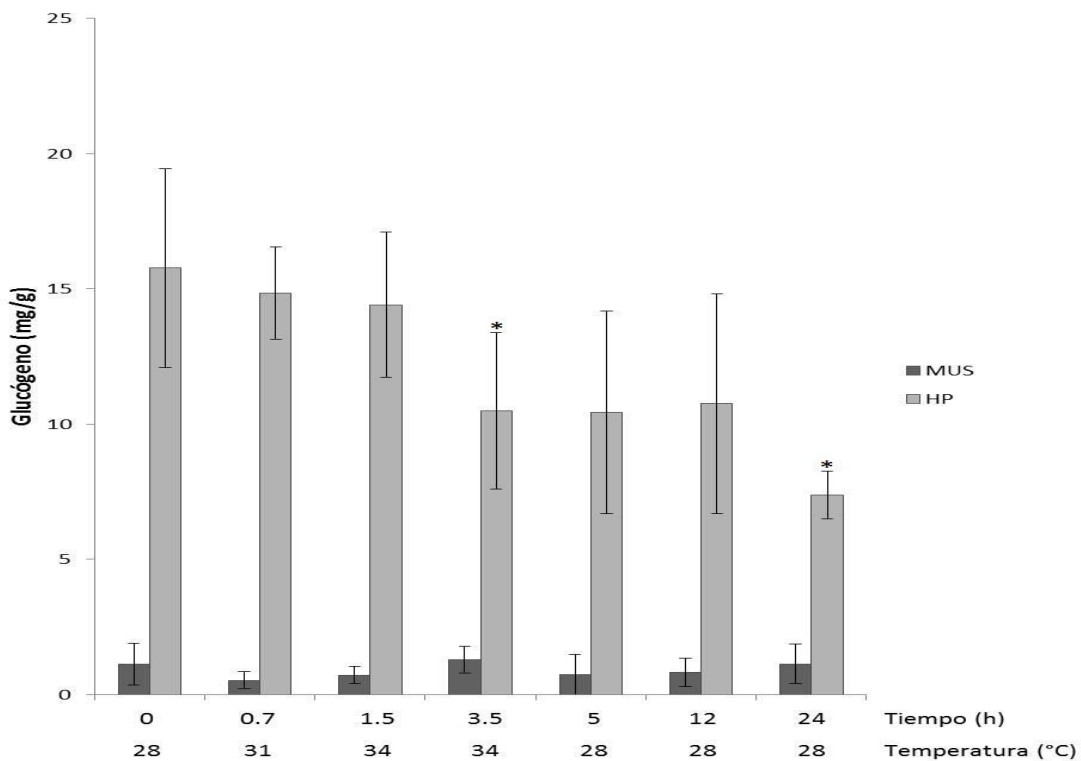


Figura 37. Contenido de glucógeno ($\bar{x} \pm ds$), en hepatopáncreas (HP) y músculo (MUS) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

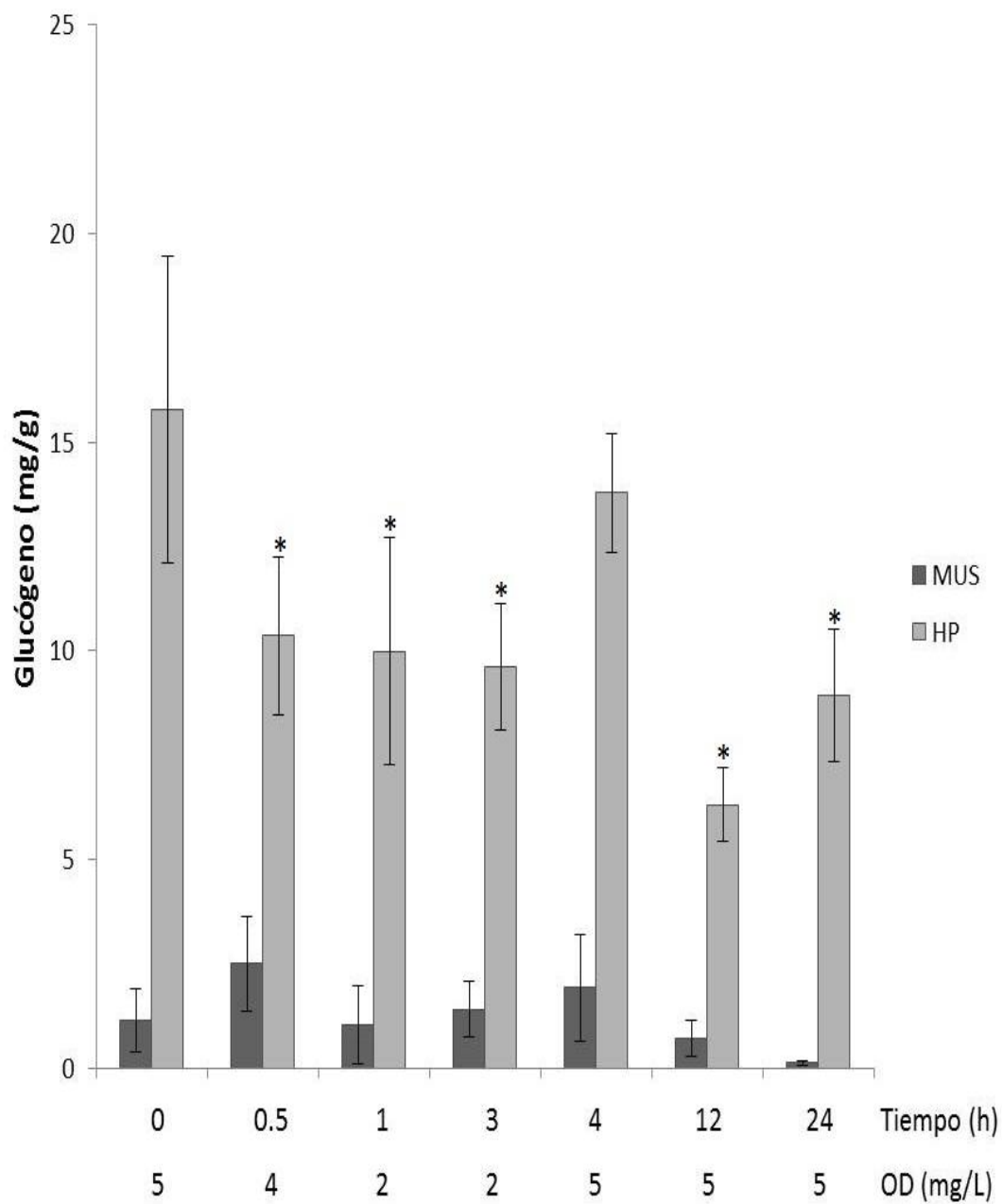


Figura 38. Contenido de glucógeno ($\bar{x} \pm ds$), en hepatopáncreas (HP) y músculo (MUS) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

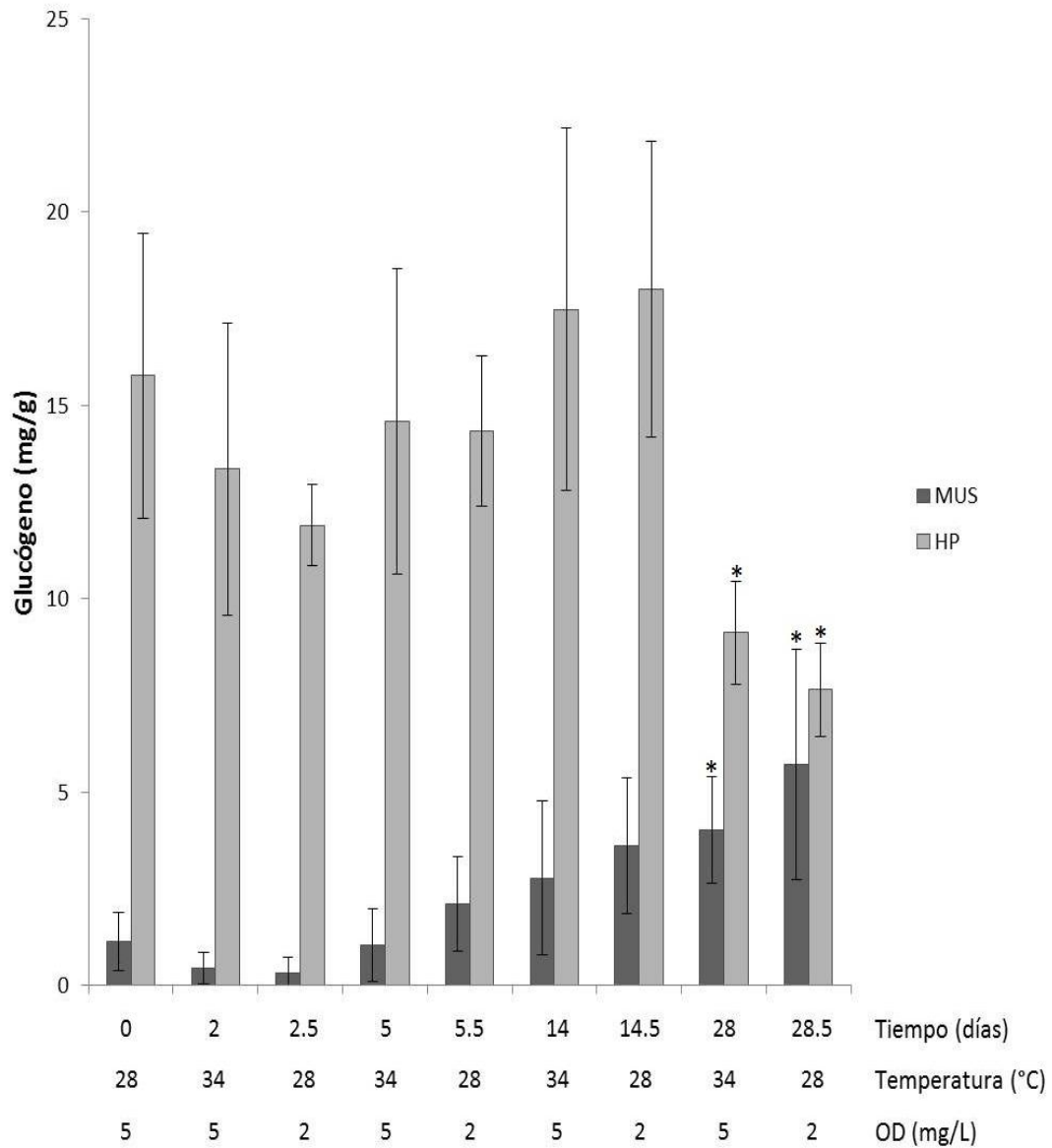


Figura 39. Contenido de glucógeno ($\bar{x} \pm ds$), en hepatopáncreas (HP) y músculo (MUS) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$).

Glucosa

El contenido de glucosa (Glu) en hemolinfa de juveniles de camarón blanco expuestos al reto agudo térmico, al reto agudo de hipoxia y a un reto crónico de ambas variables se muestran en las Figuras 40, 41 y 42. La Glu en hemolinfa se comenzó a incrementar durante la exposición aguda de ambas variables, teniendo valores mayores para las 12 h en el caso de temperatura y a las 4 h en el caso de hipoxia. A pesar de lo anterior, solo en el caso de la hipoxia se observaron diferencias significativas para las 4 h en relación al control. Durante la exposición crónica, se observó el mismo comportamiento anterior encontrando su máximo valor a los 14.5 días y después se observa un descenso a los valores iniciales para el día 28, sin embargo, estos cambios no fueron significativos.

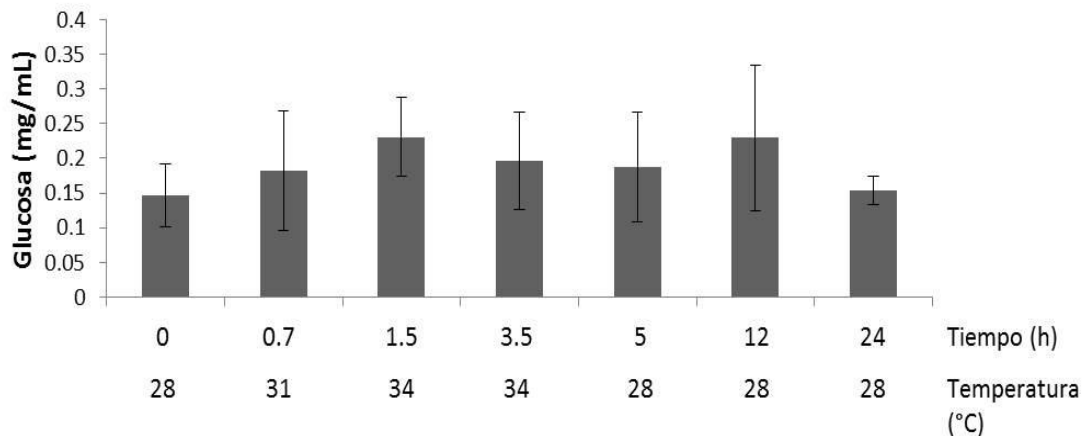


Figura 40. Contenido de glucosa ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

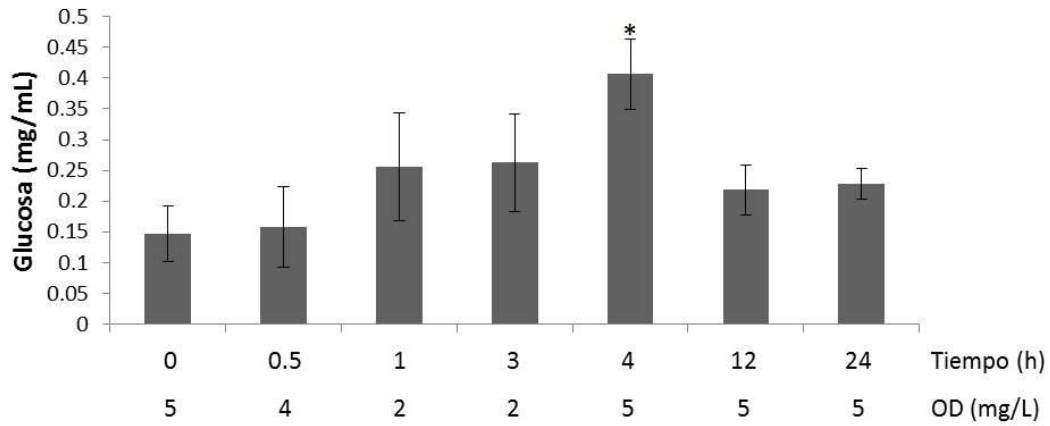


Figura 41. Contenido de glucosa ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

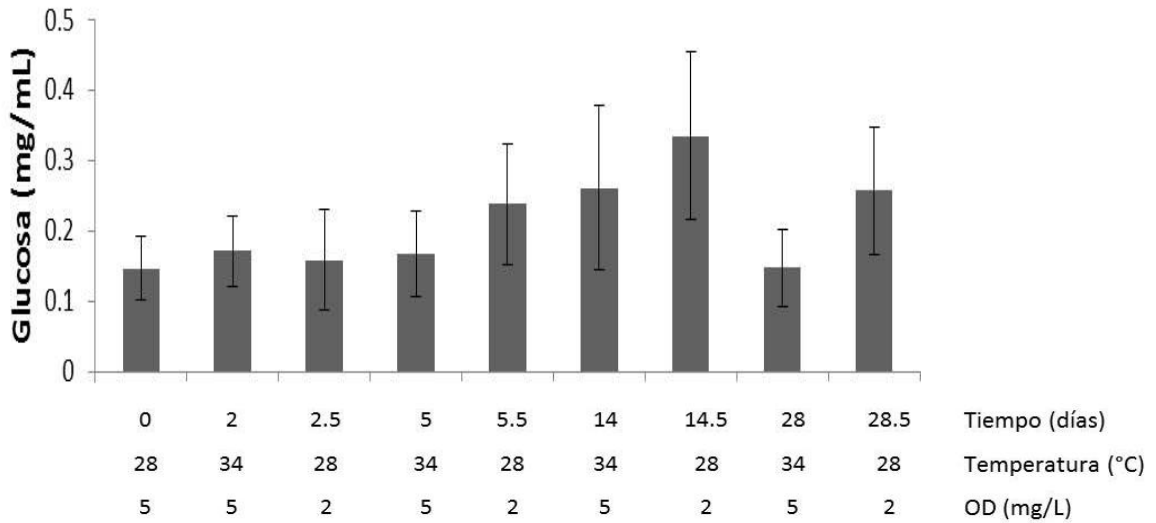


Figura 42. Contenido de glucosa ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

Lactato

El contenido de lactato (Lc) en hemolinfa de juveniles de camarón blanco expuestos a los retos agudos de temperatura, hipoxia y al reto crónico de ambas variables se muestran en las Figuras 43, 44 y 45. Para ambos retos agudos se observó un comportamiento oscilatorio del Lc con puntos significativamente menores para la hora 1.5 y 12 en el caso del reto térmico, y 0.5 y 24 h para el reto de hipoxia. En el caso del reto crónico se observa igualmente un comportamiento oscilatorio con descensos de Lc mayores (valles) durante los días 2.5 y 28, aunque solo se observó un incremento significativo para el día 14.5.

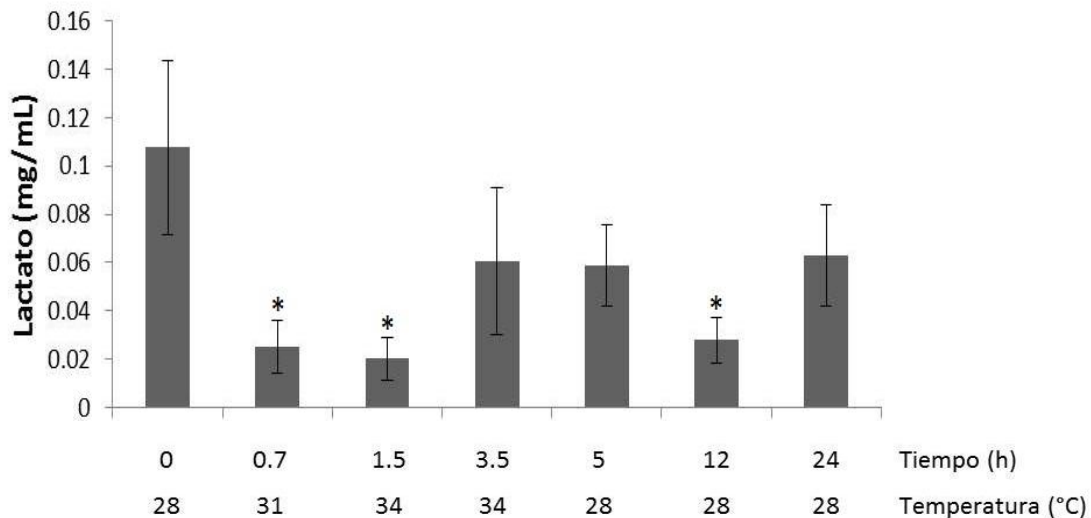


Figura 43. Contenido de lactato ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

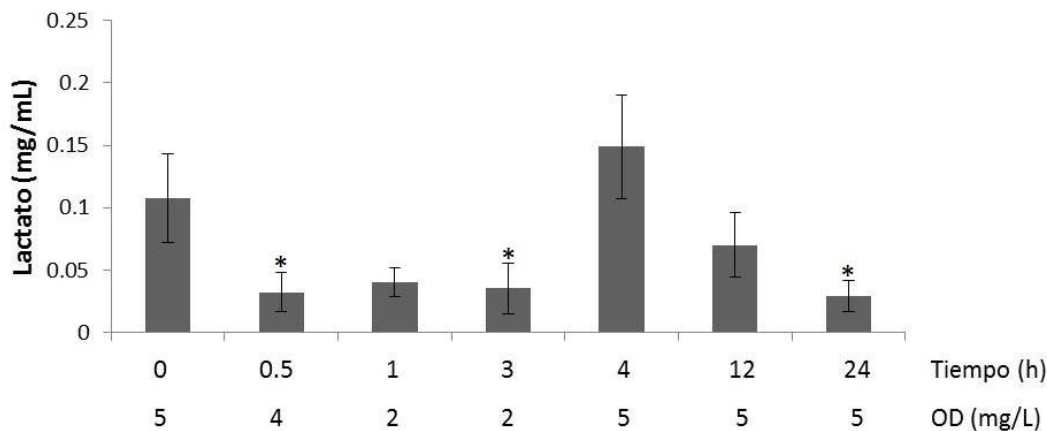


Figura 44. Contenido de lactato ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

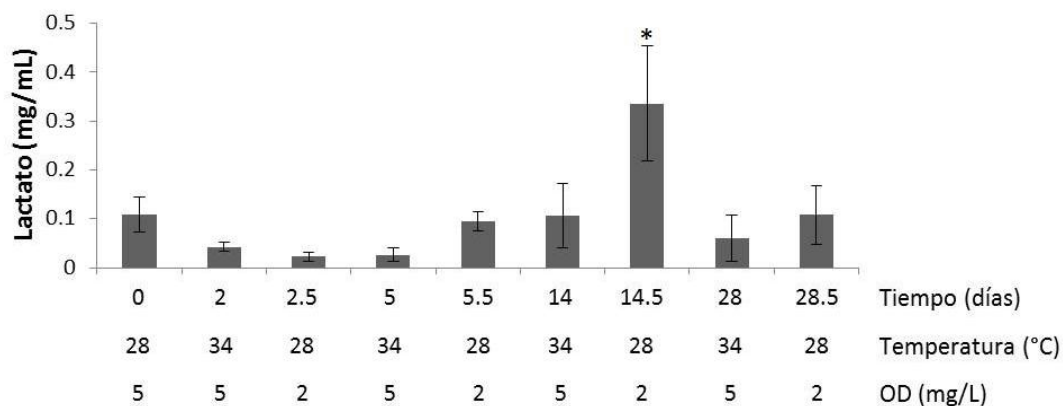


Figura 45. Contenido de lactato ($\bar{x} \pm ds$), en hemolinfa de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

Lípidos

El contenido de lípidos totales (L) en los tejidos de músculo, branquias, hepatopáncreas de juveniles de camarón blanco expuestos al reto agudo térmico, al reto agudo de hipoxia y al reto crónico de ambas variables se muestran en las Figuras 46, 47 y 48. En músculo para el reto térmico se observa un ligero incremento de L, sin embargo este no fue significativo, a diferencia del reto de

hipoxia donde el incremento fue significativo desde el principio (0.5 h) y tendiendo a descender durante la recuperación. Durante el reto crónico se observó un aumento de L a partir del día 2 y este valor se mantuvo básicamente hasta el final del reto con diferencias significativas. Para el hepatopáncreas se observó un incremento respecto al control de L conforme transcurrió la exposición en todos los retos, siendo significativamente distinto al control a partir de las 3.5 h para el reto agudo térmico, de las 0.5 h para el reto agudo de hipoxia y de 2 d para el reto crónico de ambos factores, donde la concentración de L terminó siendo tres veces mayor.

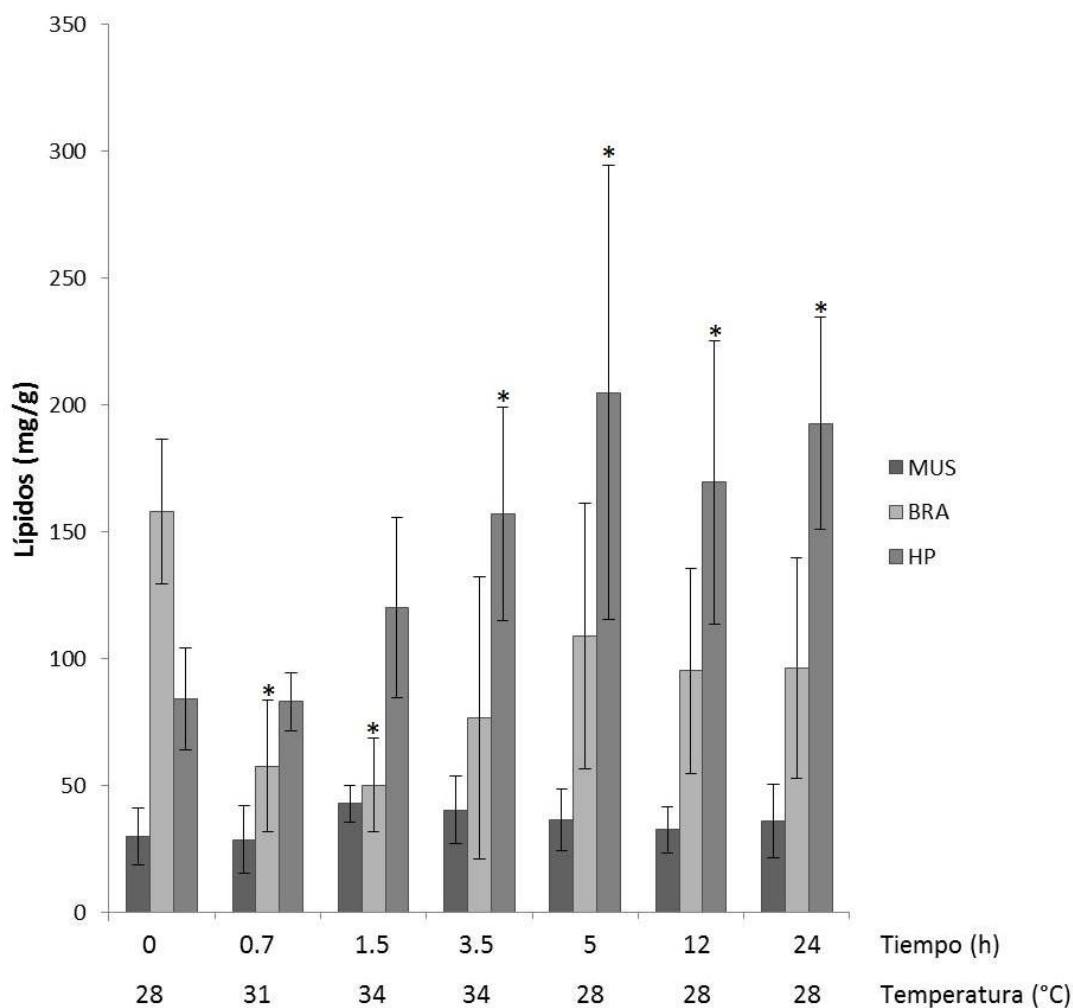


Figura 46. Contenido de lípidos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias. HP=Hepatopáncreas. MUS=Músculo.

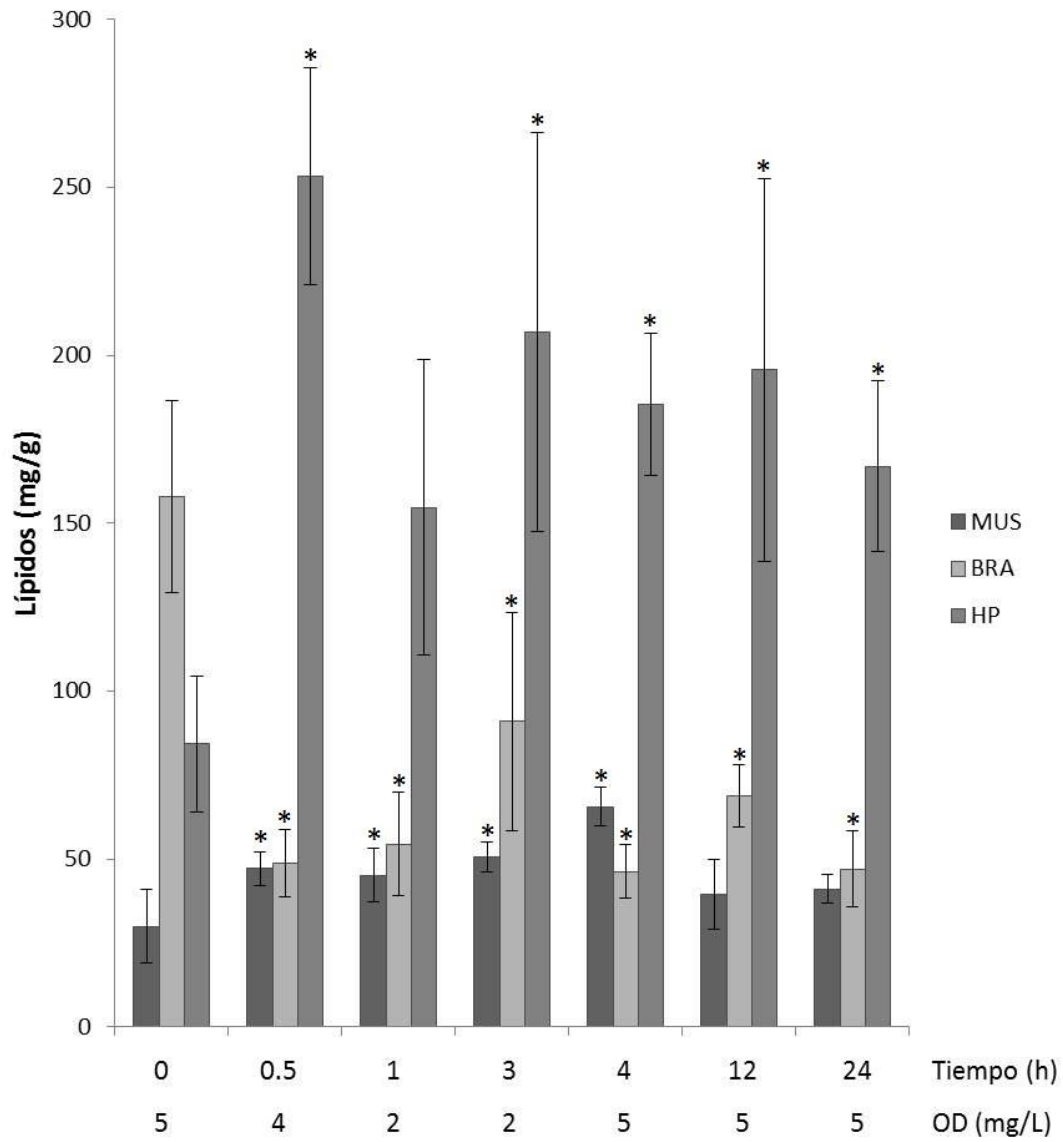


Figura 47. Contenido de lípidos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

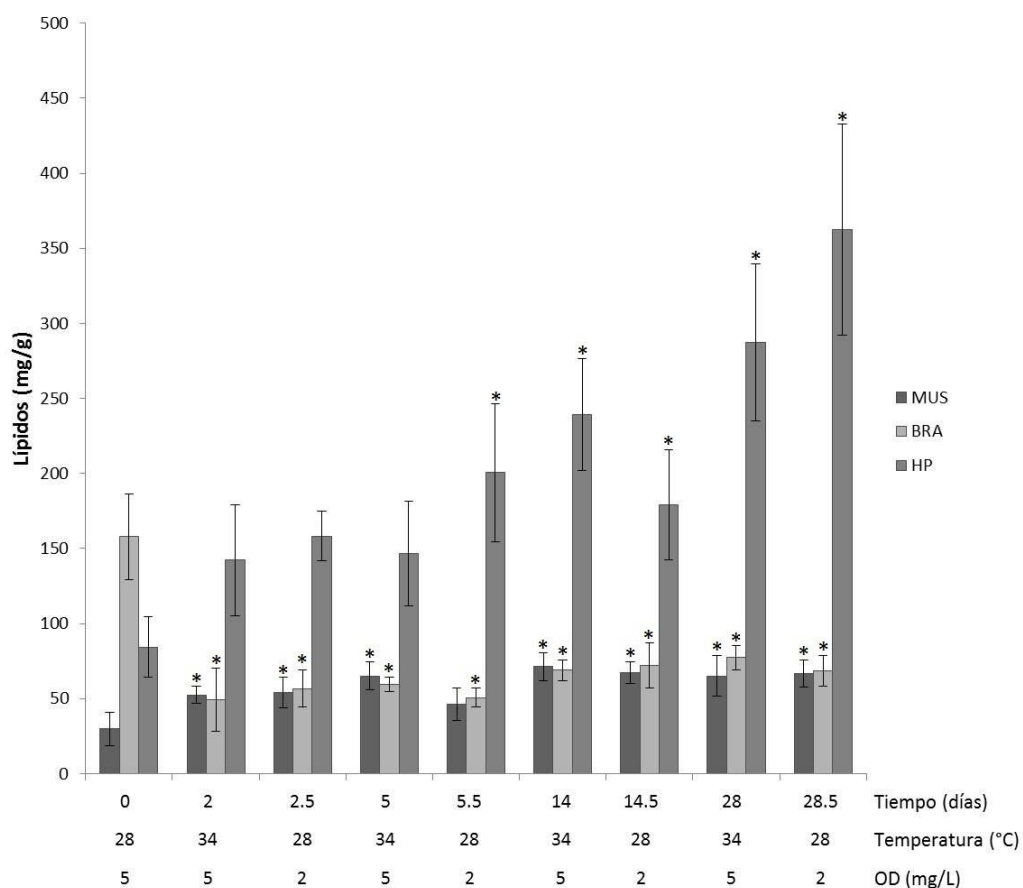


Figura 48. Contenido de lípidos totales ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$). BR=Branquias HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

Triglicéridos

El contenido de triglicéridos (Tg) en los tejidos de juveniles de camarón blanco *L. vannamei* expuestos al reto agudo térmico, al reto agudo de hipoxia y al reto crónico de ambas variables se muestran en las Figuras 49, 50 y 51. En músculo durante el reto agudo de temperatura no se presentaron diferencias significativas. Para el reto crónico los Tg observaron un incremento significativo entre los días 5 y 14.5, posteriormente regresaron a valores iniciales a los 28 días. En hepatopáncreas, para el reto agudo de temperatura el contenido de Tg se

incrementó prácticamente en todo el reto, pero el incremento sólo fue significativo para las 24 h. En el reto agudo de hipoxia los Tg tendieron a disminuir pero nunca se presentaron valores significativamente distintos respecto al control. Durante la exposición crónica el contenido de Tg permaneció constante hasta el día 5 y posterior a éste se dio un incremento significativo básicamente para todos los tiempos. En hemolinfa el contenido de Tg no se modificó para ninguno de los retos en ambas variables.

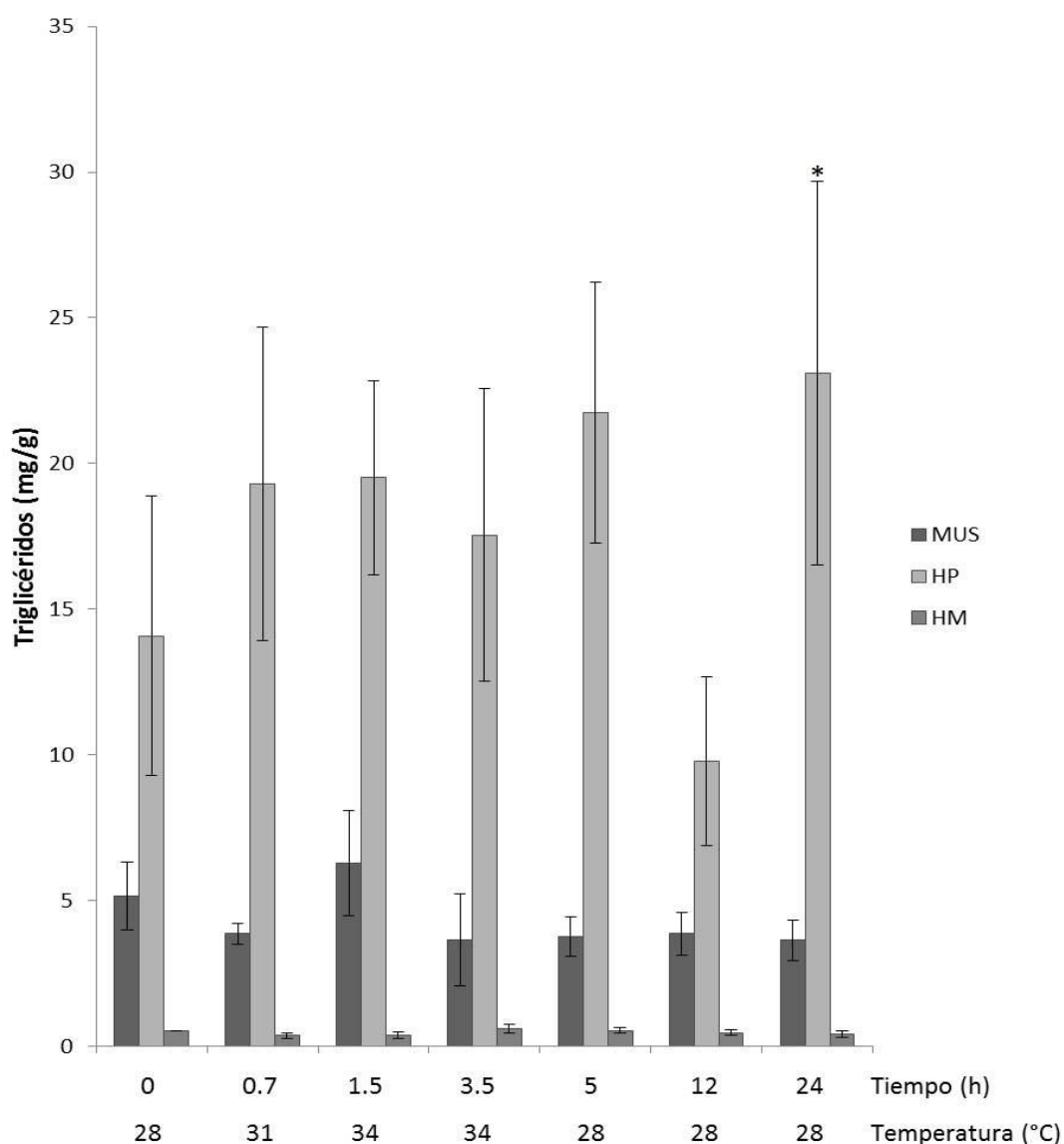


Figura 49. Contenido de triglicéridos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo.

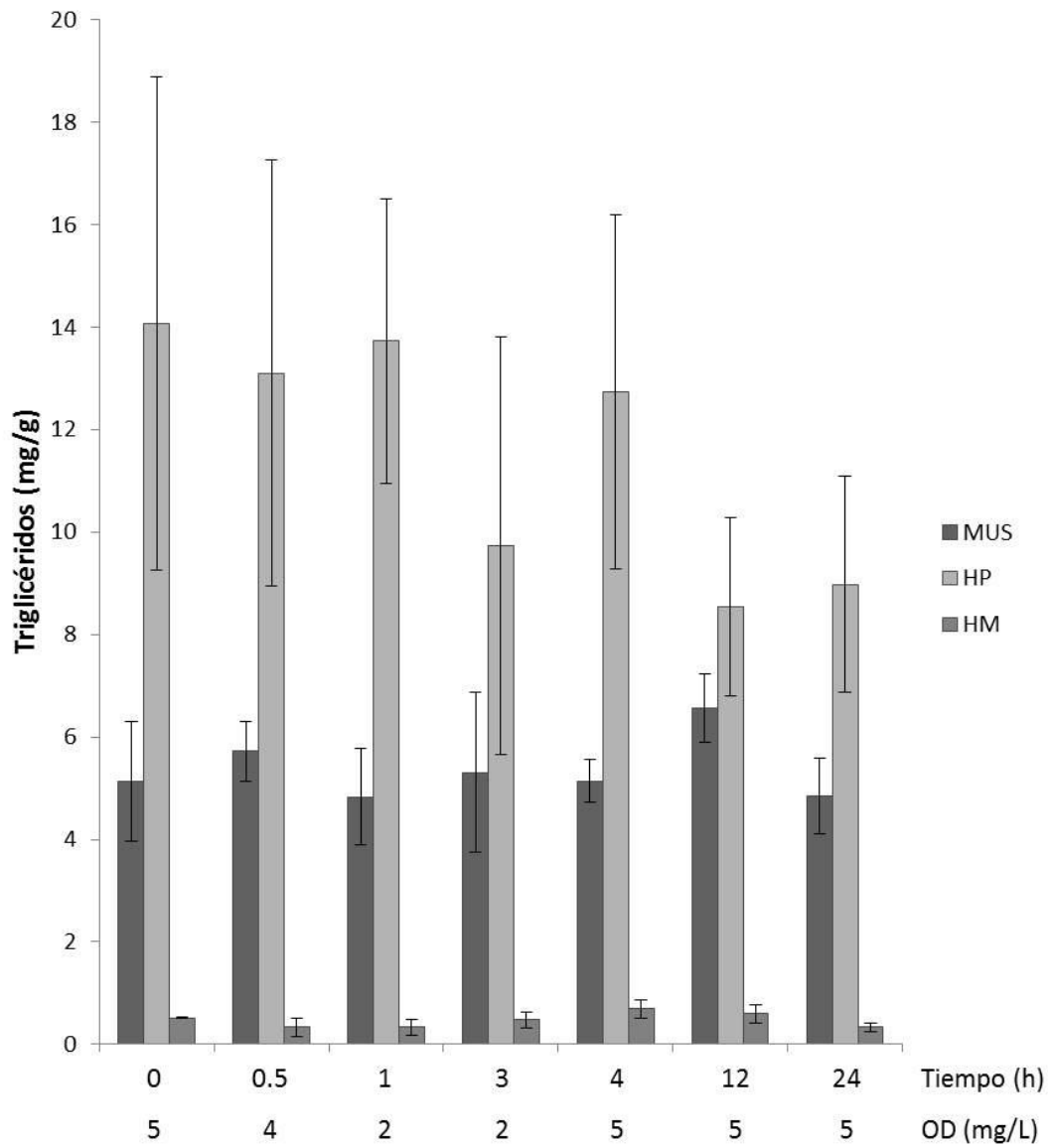


Figura 50. Contenido de triglicéridos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

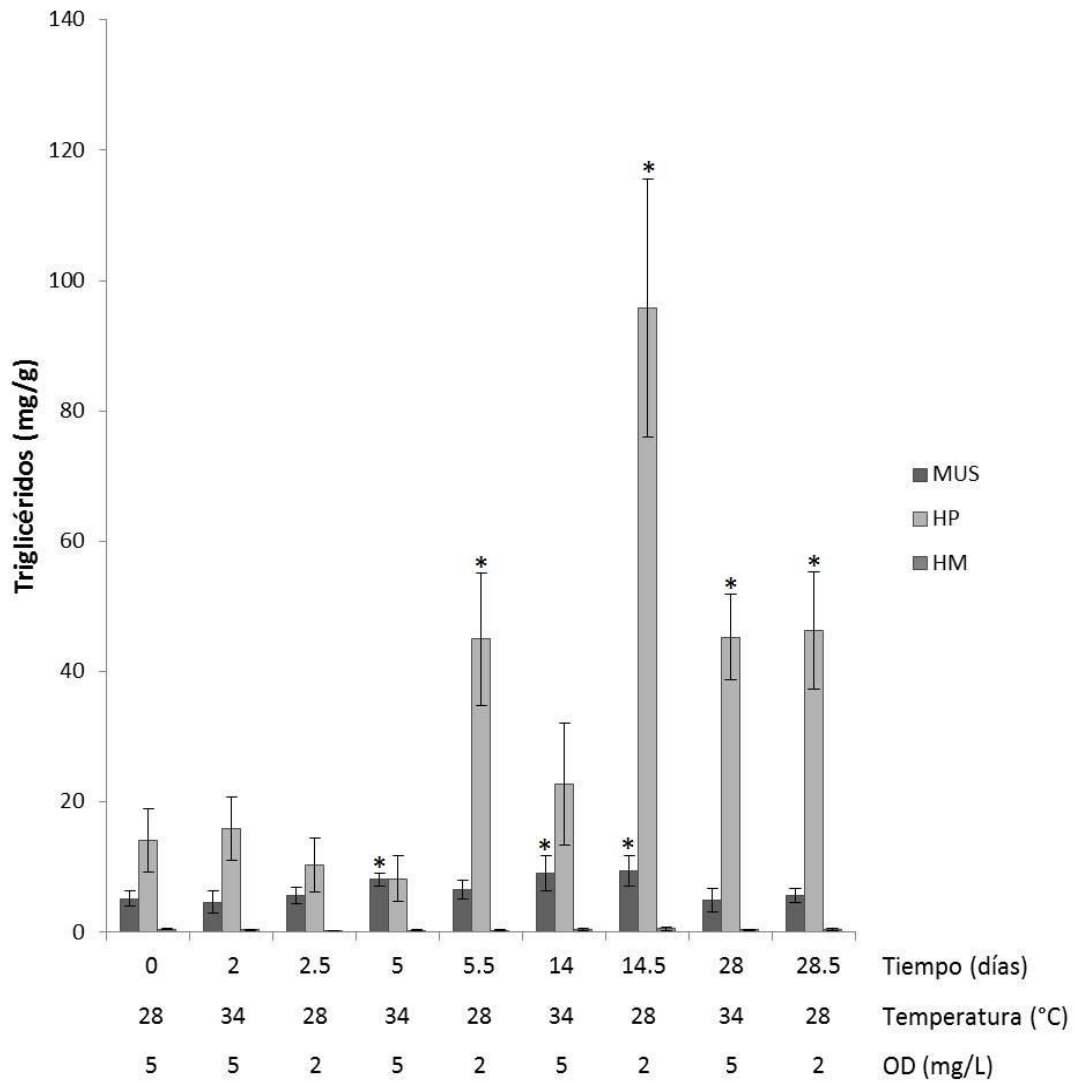


Figura 51. Contenido de triglicéridos ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

Colesterol

El contenido de colesterol (Col) en el músculo y hepatopáncreas de juveniles de camarón blanco expuestos al reto agudo térmico, al reto agudo de hipoxia y al crónico de ambas variables se muestran en las Figuras 52, 53 y 54. En el músculo durante el reto agudo de temperatura no se presentaron variaciones en el contenido de Col. Para el reto agudo de hipoxia se observó una disminución conforme transcurrió todo el experimento con diferencias significativas a partir de la hora 1. Para el reto crónico se observó una disminución desde el día 2 con diferencias significativas y a excepción del día 14.5. En hepatopáncreas durante el experimento agudo de temperatura se observó disminución paulatina del Col, alcanzando valores mínimos y significativamente diferentes en relación al control para las 3.5 y 5 h. A excepción de las 12 h no se observó recuperación. Para el reto agudo de hipoxia se observó una disminución del Col en la hora 0.5 con valores significativamente distintos al control, pero posterior a este tiempo el contenido de Col se fue incrementando recuperando los valores iniciales a partir de las 4 h donde las diferencias no son significativas. Durante el reto crónico se observaron variaciones en el contenido de Col pero no se presenta ningún patrón claro, ni son significativas. Sin embargo, a partir del día 14.5, se observó una disminución significativa del contenido de Col que se mantuvo hasta el final del reto.

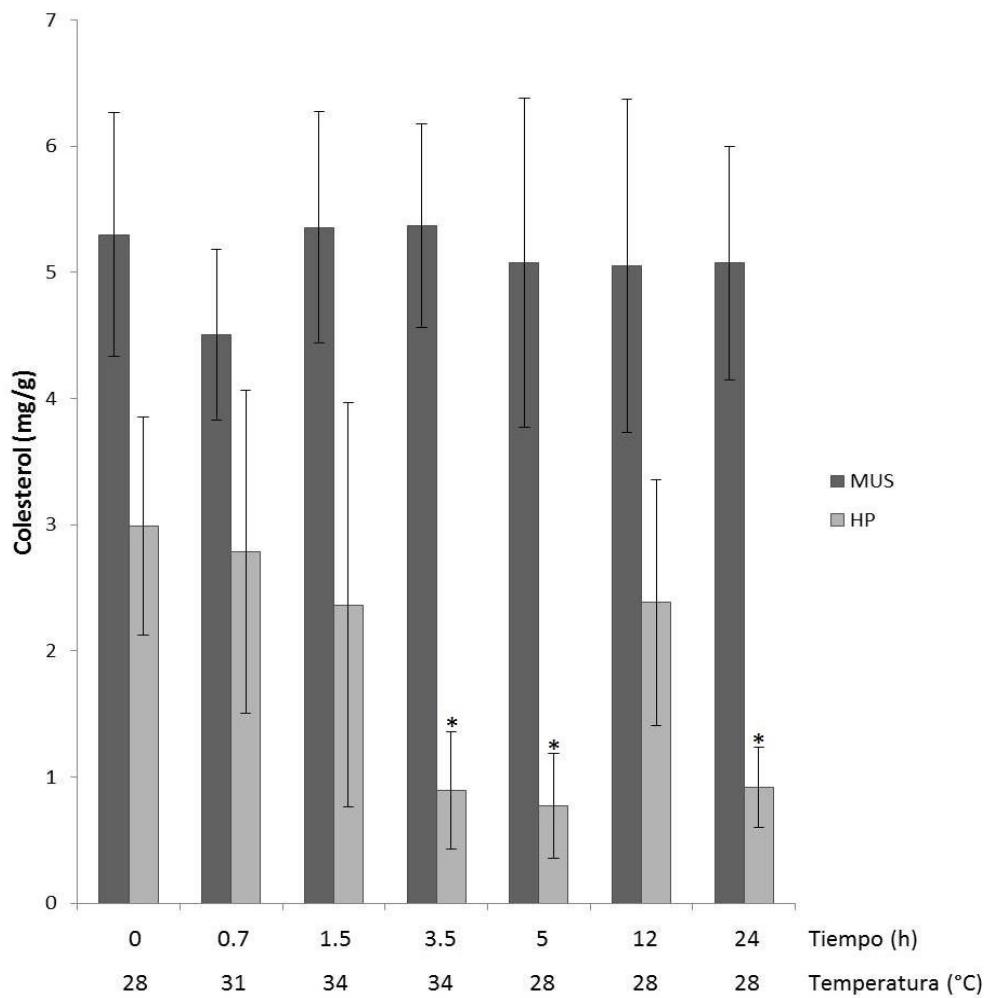


Figura 52. Contenido de colesterol ($\bar{x} \pm ds$), en músculo (MUS) y hepatopáncreas (HP) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

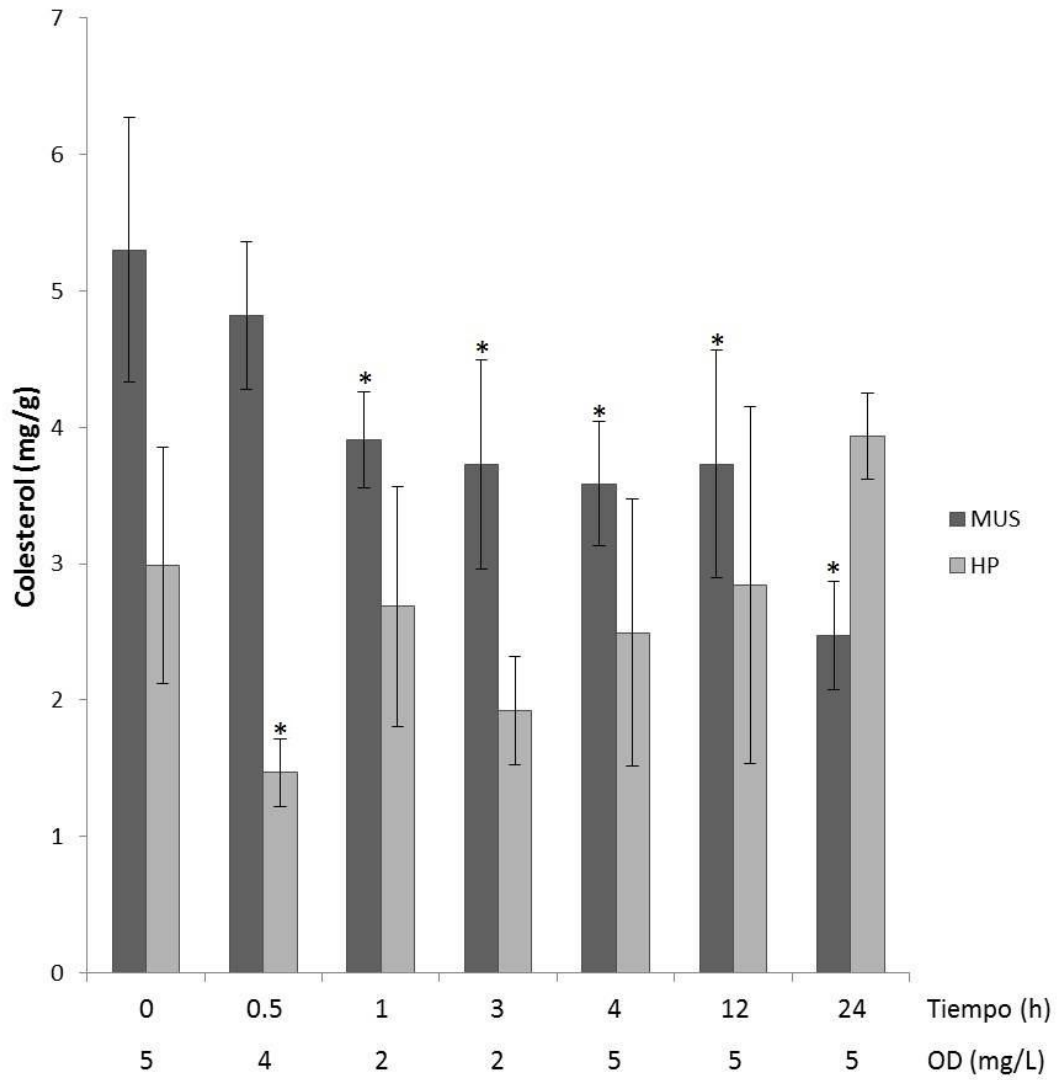


Figura 53. Contenido de colesterol ($\bar{x} \pm ds$), en músculo (MUS) y hepatopáncreas (HP) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10).

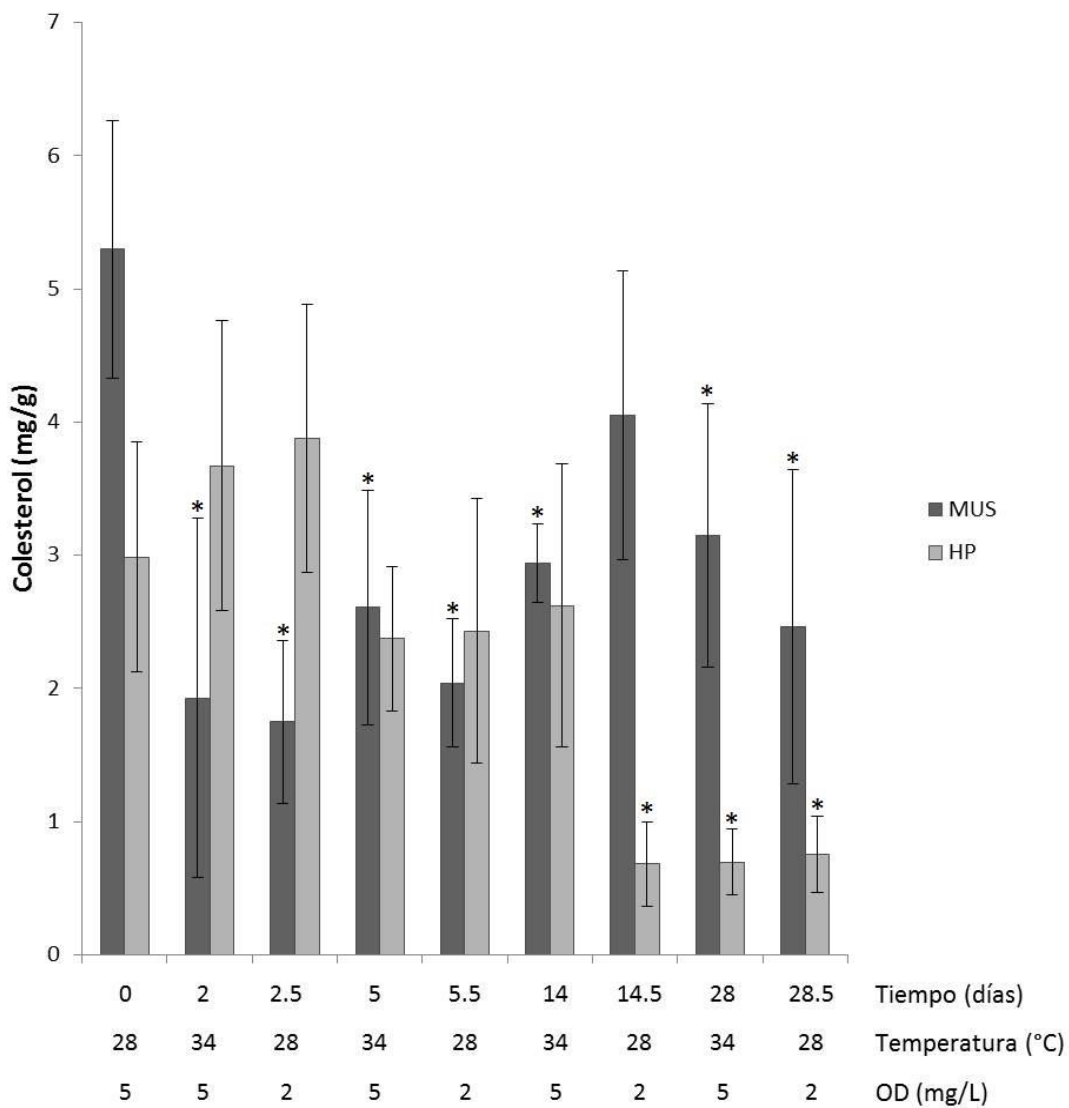


Figura 54. Contenido de colesterol ($\bar{x} \pm ds$), en músculo (MUS) y hepatopáncreas (HP) de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$).

Carotenoides

El contenido de carotenoides (Car) en el músculo, hepatopáncreas y hemolinfa de juveniles de camarón blanco expuestos al reto agudo térmico, al reto agudo de hipoxia y al reto crónico de ambas variables se muestran en las Figuras 55, 56 y 57. En el músculo los Car durante el experimento agudo de temperatura no variaron con respecto al control. Para el reto agudo de hipoxia y el reto crónico se observó una disminución significativa durante todo el experimento y sin recuperación. En hepatopáncreas los Car se incrementaron en ambos retos agudos, sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas para las 12 h en el caso del reto térmico, a diferencia del reto de hipoxia, donde básicamente en todas las horas se presentaron diferencias significativas. Para el reto crónico se observó un aumento en los primeros días del reto (2 a 5.5 días), después hubo una disminución el día 14, y para el final del reto (14.5 y 28.5 días) aumentó de nuevo la concentración de esta molécula. En hemolinfa se observó una disminución de Car en el reto agudo de temperatura (3.5 h) con respecto al control, con recuperación para las 12 h. Tanto en el reto agudo de hipoxia y como en el reto crónico, no se observaron diferencias significativas.

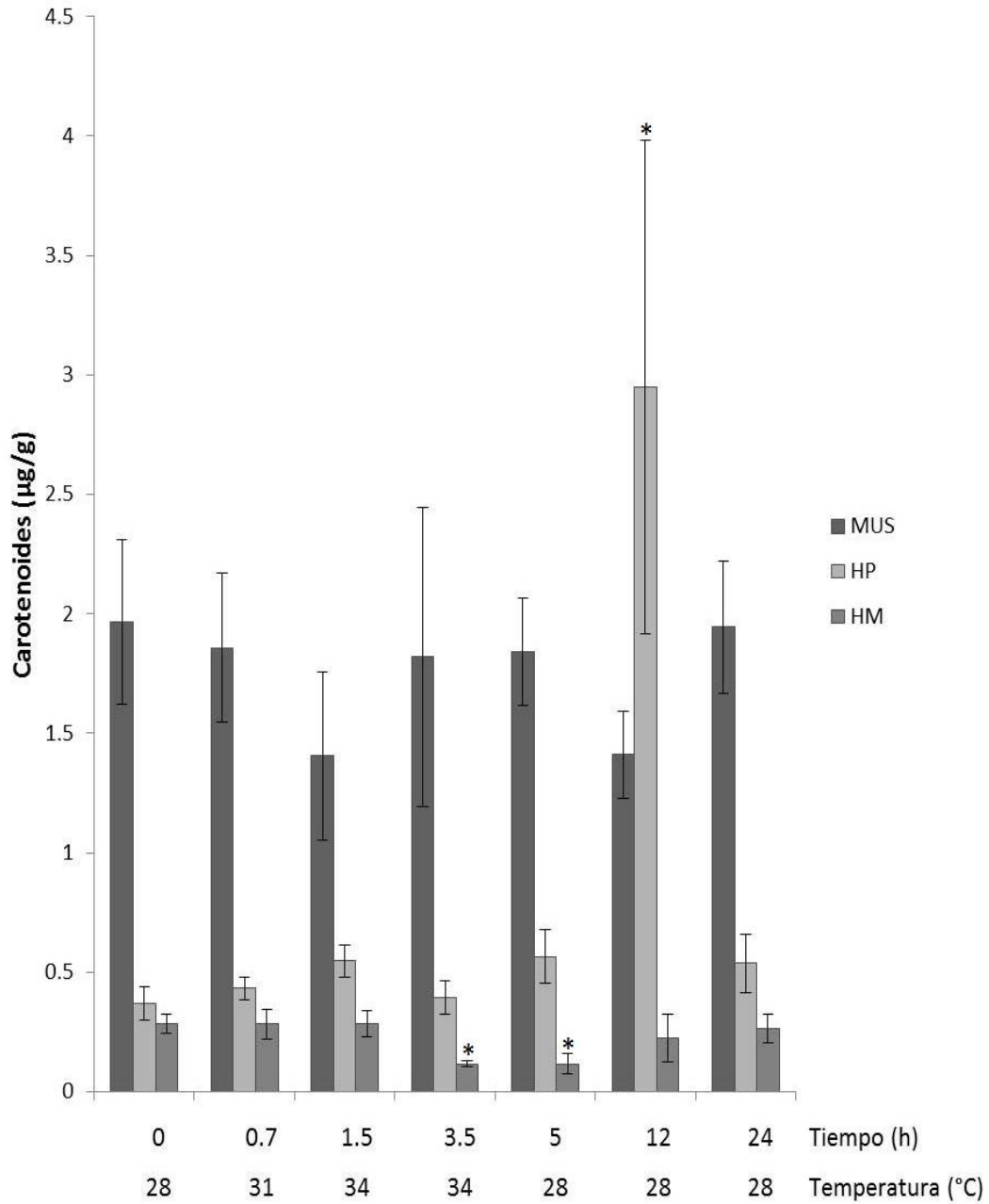


Figura 55. Contenido de carotenoides ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipertermia, manteniendo el oxígeno a saturación. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

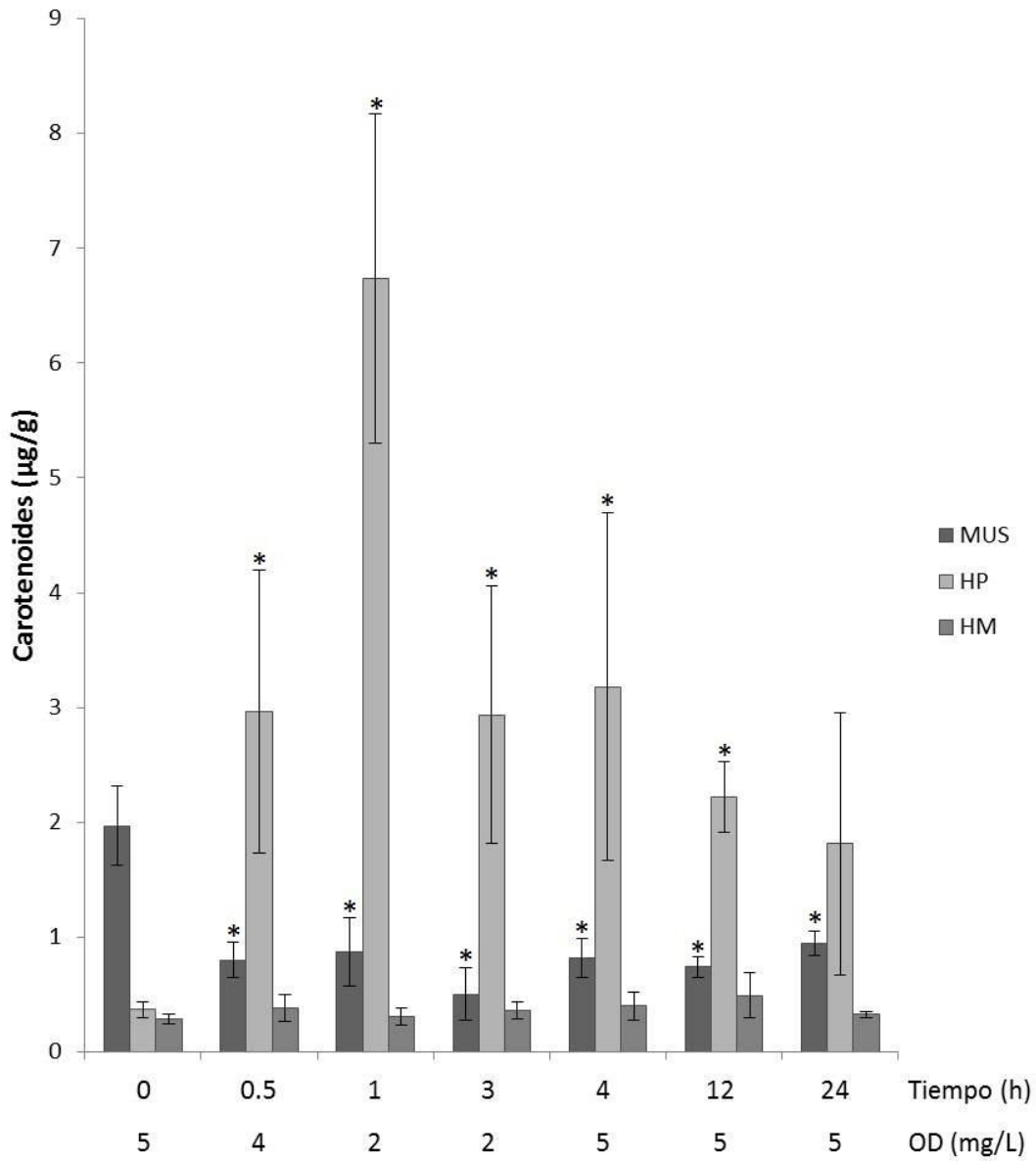


Figura 56. Contenido de carotenoides ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto agudo de hipoxia, manteniendo la temperatura a 28°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (n=10). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

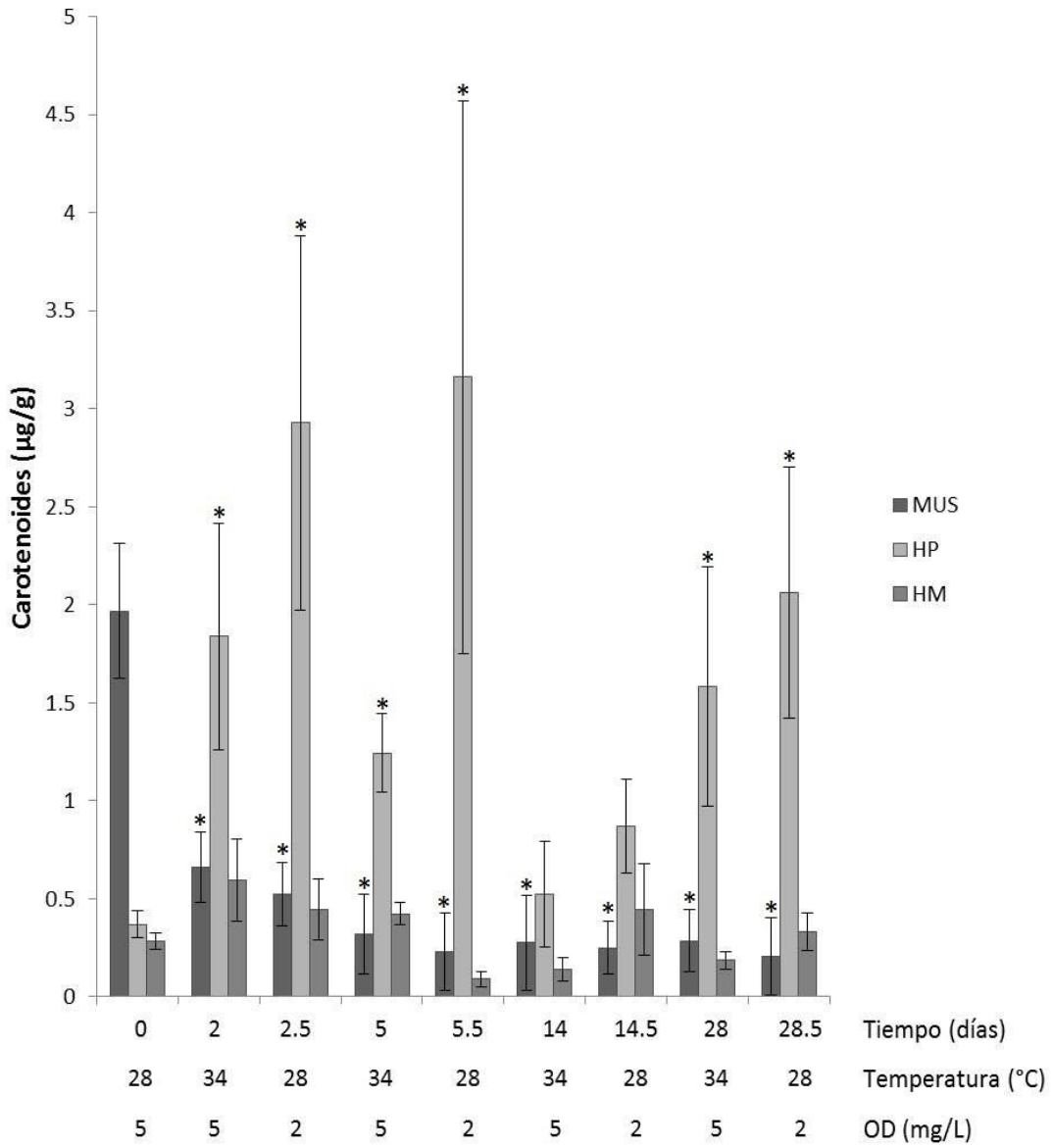


Figura 57. Contenido de carotenoides ($\bar{x} \pm ds$), en tres tejidos de juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo el reto crónico oscilando la temperatura $31 \pm 3^\circ\text{C}$ y el oxígeno disuelto a $3.5 \pm 1.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$ por un periodo de 28 días. Los asteriscos indican diferencias significativas ($n=10$). HM=Hemolinfa HP=Hepatopáncreas MUS=Músculo

EXPRESIÓN

En la Tabla II se presentan los resultados del análisis de expresión en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*), de los retos agudos de temperatura e hipoxia, así como el reto crónico de ambas variables. El análisis, es el resultado de la hibridación de genes expresados en las branquias de juveniles de camarón blanco con genes de *Caenorhabditis elegans* (microarreglo heterólogo). En esta tabla se incluyen el total de genes que arrojó el microarreglo y los genes sobre expresados y reprimidos con un valor Z- score mayor o menor a 1.5.

Tabla II. Resultado de expresión los microarreglos heterólogos de branquia de juveniles de *L. vannamei* con genes de *C. elegans*.

Reto	Total de genes expresados en el microarreglo	Genes Sub-Expresados (< 1.5 Z-Score)	Genes Sobre-Expresados (> 1.5 Z-Score)
Agudo Térmico (34°C y 5 mgO₂/L)	20,371	838	1,314
Agudo Hipoxia (34°C y 2 mgO₂/L)	20,232	1,220	1,026
Crónico Térmico (31±3°C y 3.5±1.5 mgO₂/L)	20,139	1,393	888
Crónico Hipoxia (31±3°C y 3.5±1.5 mgO₂/L)	20,225	1,234	1,110

Expresion del reto agudo de temperatura

En la Tabla III se presenta el análisis de expresión observado en los juveniles de camarón blanco, por efecto del reto agudo de temperatura a 34°C. Para realizar este análisis, el total de genes exhibidos en la Tabla II, fueron sometidos en el programa David. De los resultados arrojados en este programa, se consideraron las 5 principales rutas metabólicas sobre y sub expresadas por este reto. En la Tabla III se muestra el número total de genes implicados usados para el análisis, el porcentaje que estos genes representan del total, el número de genes implicados en las 5 rutas metabólicas consideradas y el porcentaje de genes que representan estos genes del análisis.

Tabla III. Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos al reto agudo de temperatura a 34°C, manteniendo el oxígeno disuelto a saturación. La hibridación se realizó con *C. elegans*.

RETO AGUDO TÉRMICO	No. de genes implicados	No. Genes ubicados por DAVID	Principales 5 rutas metabólicas modificadas	# Genes en la ruta
Reprimidos	838 (4.1%)	729 (87%)	Organización de membrana	8
			Respuesta de defensa	8
			Organización de cromosomas	12
			Organización de cromatina	9
			Actividad metaloendopeptidasa	15
Sobre-Expresados	1313 (6.4%)	1113 (84.7%)	Actividad transportadora del ion calcio a través de membrana con actividad ATPasa	3
			Unión de nucleótidos	70
			Unión del ion magnesio	14
			Crecimiento	111
			Glucólisis	6

Expresión del reto agudo de hipoxia

En la Tabla IV se presenta el análisis de expresión observado en los juveniles de camarón blanco, por efecto del reto agudo de hipoxia a 2 mgO₂/L. El análisis se realizó tomando en cuenta las mismas consideraciones descritas en el reto agudo térmico.

Tabla IV. Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos al reto agudo de hipoxia 2 mgO₂/L, manteniendo la temperatura a 28°C. La hibridación se realizó con *C. elegans*.

RETO AGUDO HIPOXIA	No. de genes implicados	No. Genes ubicados por DAVID	Principales 5 rutas metabólicas modificadas	# Genes en la ruta
Reprimidos	1220 (6.2%)	1062 (87%)	Proceso metabólico celular de modificación de aminoácidos	8
			Actividad oxidorreductasa (donadores con incorporación de O ₂)	6
			Degradación de lisina	9
			Proceso metabólico celular de aminas biogénicas (neurotransmisores)	6
			Modificación de cromatina	8
Sobre-Expresados	1026 (5.1%)	885 (86.2%)	Transporte mediante vesículas	14
			Proceso biosintético de ácidos grasos insaturados	3
			Regulación positiva de crecimiento	28
			Unión de nucleótidos (RNA)	77
			Constituyente estructural del ribosoma	13

Expresión del reto crónico de temperatura

La Tabla V presenta el análisis de expresión observado en los juveniles de camarón blanco, por efecto del reto crónico de temperatura $31\pm 3^{\circ}\text{C}$. El análisis se realizó tomando en cuenta las mismas consideraciones descritas en el reto agudo térmico.

Tabla V. Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos al reto crónico de temperatura $31\pm 3^{\circ}\text{C}$, el oxígeno durante el bioensayo varió $3.5\pm 1.5\text{ mgO}_2/\text{L}$. La hibridación se realizó con *C. elegans*.

RETO CRÓNICO TÉRMICO	No. de genes implicados	No. Genes ubicados por DAVID	Principales 5 rutas metabólicas modificadas	No. Genes en la ruta
Reprimidos	888 (4.4%)	777 (87.5%)	Ribosoma	13
			Glucólisis	6
			Regulación de crecimiento	112
			Constituyente estructural del ribosoma	18
			Actividad fosfofructocinasa	3
Sobre-Expresados	1396 (6.9%)	1206 (86.4%)	Dominio de unión NAD(P)	18
			Glucosa/ribitol deshidrogenasa	10
			Proceso biosintético de péptidos no ribosomales	6
			Actividad endopeptidasa	25
			Actividad oxido-reductasa (donador CH-CH, aceptor NAD(P))	6

Expresión del reto crónico de hipoxia

La Tabla VI se presenta el análisis de expresión observado en los juveniles de camarón blanco, por efecto del reto crónico de hipoxia 3.5 ± 1.5 mgO₂/L. El análisis se realizó tomando en cuenta las mismas consideraciones descritas en el reto agudo térmico.

Tabla VI. Resultado del análisis de expresión del microarreglo heterólogo entre branquias de juveniles de *L. vannamei* sometidos al reto crónico de hipoxia 3.5 ± 1.5 mgO₂/L, la temperatura durante el bioensayo varió 31 ± 3 °C. La hibridación se realizó con *C. elegans*.

RETO CRÓNICO HIPOXIA	No. de genes implicados	No. Genes ubicados por DAVID	Principales 5 rutas metabólicas modificadas	# Genes en la ruta
Reprimidos	1110 (5.7%)	968 (87.2%)	Regulación positiva de crecimiento	144
			Actividad helicasa de DNA	5
			Oxidoreductasa dependiente de FAD	5
			Regulación positiva de la tasa de crecimiento	125
			Glucólisis	6
Sobre-Expresados	1234 (6.3%)	1073 (87%)	Ribosoma	14
			Desarrollo de genitales	56
			Focalización de proteínas hacia la membrana	5
			Derivación de energía por oxidación de compuestos orgánicos	8
			Organización interna de la membrana mitocondrial	3
			Importación de proteínas hacia el interior de la membrana mitocondrial	3

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron dos tipos de retos (agudos y crónicos) para observar la capacidad de respuesta que tiene el camarón blanco ante dos de las variables más importantes que afectan su estado fisiológico (la temperatura y el oxígeno) y por lo tanto su condición y rendimiento durante el cultivo (Newman, 2000). Los retos fueron diseñados con base en la información de registros de alta frecuencia obtenidos a partir de estuches de cultivo de diferentes entidades del Noroeste mexicano (Portillo y Magallón, *coms pers*). El trabajo además de observar los cambios en las respuestas fisiológicas, el contenido bioquímico y la expresión, buscó establecer relación entre estas respuestas para entender la forma en que los organismos compensan el estrés provocado.

RESPUESTA FISIOLÓGICA

Durante los cambios agudos térmico y de hipoxia, los juveniles inhibieron su tasa de ingestión (TI) y particularmente se observó que ante el reto de temperatura los organismos no tuvieron la capacidad de recuperarse a las 24 h (19 h posteriores al reto). Sin embargo, durante el reto crónico de ambas variables, la TI mantuvo una relación positiva con los cambios térmicos, aumentando con la temperatura a 34°C y disminuyendo a 28°C. Esta respuesta es usual en organismos poiquiloterms, debido a que el incremento de temperatura impone una mayor demanda metabólica (Kurmaly *et al.*, 1989a; Ponce-Palafox *et al.*, 1997). El hecho de que en la respuesta aguda no se observó esta relación, es posible porque al inicio los organismos tienen un tiempo de adaptación antes de poder responder incrementando su TI para hacer frente al estrés impuesto por la temperatura. En cuanto a la hipoxia en la respuesta aguda, el decremento de la TI muy posiblemente estuvo asociado al cambio metabólico bajo por la falta de oxígeno (Mugnier *et al.*, 2008), patrón que se mantuvo con los cambios oscilantes de oxígeno durante el reto crónico.

La tasa de respiración (TR) de los camarones expuestos a los cambios agudos, no mostró variaciones en relación a la temperatura y tuvo un descenso significativo con la hipoxia. Se sabe que en camarones peneidos, la TR está afectada por variables ambientales como salinidad, oxígeno disuelto, temperatura, intensidad de la luz (Bridges y Brand, 1980). Particularmente con la temperatura la TR mantiene una relación directa, ya que los cambios térmicos provocan variaciones metabólicas importantes, por lo que se esperaba que ante el cambio térmico la TR tuviera un incremento, lo cual no sucedió. Sin embargo, es común que en las tasas fisiológicas se observe un retraso que permite amortiguar los impactos, antes de provocar una alteración mayor en los organismos, esperando que la condición ambiental estresante cambie. Probablemente, si los organismos hubieran estado sometidos mayor tiempo al reto térmico, se hubiera observado un incremento de la TR. Lo anterior se ve apoyado en las observaciones durante la respuesta crónica, donde la TR varió proporcionalmente con los cambios térmicos e inversamente proporcional en relación a la concentración de oxígeno disuelto.

En este trabajo, los juveniles de camarón blanco no vieron alterada la tasa de excreción de amonio (TE) durante los retos agudos. Sin embargo, se observó que durante el periodo de recuperación la TE disminuyó con el incremento térmico y se incrementó con la hipoxia, indicando una respuesta tardía conforme transcurrió el experimento. La disminución de la TE por el efecto térmico, es posible que se relacione con el descenso de la TI, ya que se disminuyen los desechos metabólicos nitrogenados por el bajo consumo de alimento. De igual forma durante el reto agudo de hipoxia, la TI presentó una compensación total en la etapa de recuperación y al incrementarse el consumo de alimento, se observó el incremento de la TE. El efecto observado en el reto térmico, también ha sido reportado por Cheng y Kou (1996), donde un incremento en la temperatura disminuye la excreción de amonio, mientras que incrementa la excreción de urea. Sin embargo, en el presente estudio no se cuantificó la excreción de urea, por lo que no se puede asegurar lo anterior. Durante el reto crónico se observó una

tendencia a incrementar la TE a lo largo del bioensayo, aunque no tuvo diferencias significativas. Lo anterior puede estar relacionado con el estrés provocado a lo largo del bioensayo: existen trabajos que reportan que camarones como *Marsupenaeus japonicus*, ante un cambio ambiental o un estresor, incrementan la excreción de amonio y urea. Esto es reflejo del catabolismo de los aminoácidos, así como la degradación de purinas y pirimidinas (Lee y Cheng, 2004).

La eficiencia de absorción (EA) básicamente no varió en ambos retos. Sólo se observó la disminución de la EA para el reto crónico al día 14 durante la exposición a hipertermia. Esto indica que aparentemente ante los cambios ambientales por temperatura e hipoxia, los juveniles de camarón blanco, no modifican la capacidad para absorber los nutrientes. Sin embargo, se observó que ante una situación de estrés sostenido, la EA disminuyó hacia la mitad del reto, aunque se observó una recuperación para el final del experimento que no es consistente con lo anterior. Prácticamente no existen trabajos que aborden los cambios en la EA por efecto de estrés ambiental. Estos estudios han sido enfocados especialmente a organismos filtradores donde la concentración de alimento (Widdows *et al.*, 1979; Bayne y Newell, 1983) y el contendio bioquímico de éste, es determinante en el % de material absorbido (Farías *et al.*, 1997; Navarro *et al.*, 2000).

Para el presente estudio, los camarones no presentaron cambios en el potencial de crecimiento (PC) durante ambos retos agudos, aunque en el reto térmico, se observó una respuesta a incrementar su PC en la etapa de recuperación. A lo largo del reto crónico, el PC observó cambios en donde se ve reprimido por la temperatura alta. La gran mayoría de los estudios sobre balance energético se han llevado a cabo para determinar la dieta adecuada para el cultivo de las diferentes especies de penéidos (*L. setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*) en estadios tempranos de larvas y postlarvas (Rosas, 1996; Rosas, *et al.*, 1998;

Rosas, *et al.*, 2001; Brito, *et al.*, 2004; Pascual, *et al.*, 2004; Rosas, *et al.*, 2004;) y son escasos los estudios realizados en juveniles (Rosas, *et al.* 1998; Pascual, *et al.* 2004, Puente-Carreón, 2009). Por lo que es difícil hacer una comparación de los resultados obtenidos.

CONTENIDO BIOQUIMICO

El presente estudio los juveniles de camarón blanco disminuyeron su contenido proteico en los tejidos de músculo y hepatopáncreas. En el caso del músculo, sólo se presentaron diferencias significativas a largo plazo, sin embargo en el hepatopáncreas, este descenso fue estadísticamente significativo en ambos retos (agudo y crónico), y factores (hipertermia e hipoxia). New (1976), propuso que la fuente primaria de energía para crustáceos son las proteínas, observación que ha sido apoyada por trabajos posteriores (Barclay *et al.* (1983). Además, las proteínas de la dieta, han sido señaladas como las responsables de procesos hormonales y reproductivos importantes (Ceballos-Vázquez *et al.*, 2003). Lo anterior indica que ante un evento estresante los camarones hacen uso de las proteínas para satisfacer su demanda energética en tejidos como el músculo. Sin embargo, en el hepatopáncreas el consumo proteico es mayor porque aparte de la obtención de energía, se involucra en diversos procesos (como la digestión de nutrientes). Por otra parte, este compuesto es movilizado para restaurar y/o mantener procesos en tejidos como lo son el equilibrio osmótico (Rosas *et al.*, 2002; 2004); y la respuesta inmune (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). En el caso de las branquias no se observaron diferencias en ninguno de los retos agudos, ni crónicos. El contenido de proteínas en hemolinfa se mantuvo sin cambios tanto en el bioensayo agudo como en el crónico. El contenido de hemocianina en hemolinfa aumentó aproximadamente un 90% al final del reto crónico para ambos estresores (hipertermia e hipoxia). Este resultado puede deberse a que la hemolinfa tiene la capacidad de llegar directamente a todos los tejidos y transportar los nutrientes, excretas, oxígeno y otras moléculas importantes (Pascual *et al.*, 2003b); por lo

que, aunque exista un consumo de proteínas para satisfacer las demandas metabólicas, no se percibe por ser el tejido en el cual se reciben y transportan las reservas de otros tejidos. En una situación de estrés, el papel de la hemocianina en la hemolinfa es distinto, ya que cuando la temperatura se incrementa, aumenta el metabolismo, provocando mayores demandas de respiración celular, usando más hemocianina para el transporte de oxígeno. Durante la hipoxia el organismo necesita realizar más eficientemente la transferencia de oxígeno entre tejidos debido al poco contenido de oxígeno ambiental, explicando así el aumento en la hemocianina. De esta forma durante una exposición a estrés, es muy probable que se presenten cambios en algunos tipos proteicos de la hemolinfa (por ejemplo enzimas), sin embargo, el contenido global de proteínas es conservado. Un claro ejemplo de lo que se observó es lo documentado por Astete-Espinoza *et al.* (2010), donde el contenido total proteico en la hemolinfa se mantiene sin cambios, a pesar de las diferencias en hemocianina.

En el presente estudio se observó un aumento en el contenido de carbohidratos en músculo (más del triple que en el control), en ambos retos agudos (hipertermia e hipoxia), y además en la respuesta crónica, donde el aumento fue aproximadamente diez veces mayor. Las branquias tuvieron un comportamiento similar, donde su contenido de carbohidratos se incrementó más del doble en los retos agudos y se multiplicó cinco veces en el reto crónico. Por el contrario, en hepatopáncreas los carbohidratos disminuyeron un 50% al final de ambos retos (hipertermia e hipoxia), tanto en la respuesta aguda como en la crónica. Lo anterior indica que los organismos recurren a la utilización de carbohidratos ante una condición de estrés (músculo y branquias), y además, no modifican su respuesta después de un tiempo prolongado, acumulando más carbohidratos conforme el tiempo de exposición al factor estresante aumenta. Normalmente en el músculo las principales reservas son las proteínas (Dall *et al.*, 1990), sin embargo dada la alta demanda de energía en condiciones de estrés como la hipoxia y el incremento térmico, y el aumento de la actividad y la necesidad de

refugiarse, como respuesta a ellos, hace que el músculo recurra a almacenar carbohidratos para su rápida utilización en forma de glucosa. En el caso de las branquias este aumento puede deberse a que juegan un papel fundamental para la regulación de procesos como el equilibrio oxidación-reducción en hemolinfa y es el órgano donde se lleva a cabo la respiración, entre otras funciones importantes (Astete-Espinoza *et al.*, 2010). La disminución de carbohidratos en hepatopáncreas indicó que este tejido funciona como reserva ante una condición de estrés. Dado que el hepatopáncreas es el órgano encargado de la degradación bioquímica, absorción posterior de nutrientes y almacén de energía, es muy probable que la disminución de carbohidratos observada en este órgano, obedezca a una movilización de reservas de fácil degradación (como el glucógeno), ante la demanda de energía en respuesta al estrés (Van Aardt, 1988), sugiriendo que tanto el músculo como las branquias pudieron incrementar sus reservas de carbohidratos por el aporte del hepatopáncreas. El decremento observado en el hepatopáncreas, no fue proporcional al incremento observado en los otros tejidos (músculo y branquia), indicando que estos compuestos fueron obtenidos a partir del alimento y como se indicó anteriormente, el hepatopáncreas también pudo hacer uso de las proteínas como fuente de energía, minimizando el uso de los carbohidratos. Cambios similares en carbohidratos como los reportados en este trabajo también han sido observados por otros autores estableciendo que la hiperglicemia de camarones penéidos es un componente común de la respuesta de estrés por efecto de manejo (Aparicio-Simón *et al.*, 2010), hipoxia (Hall y Van Ham, 1998), aumento de temperatura (Carreño-Mejía, 2009), muestreos repetitivos de hemolinfa (Racotta y Palacios, 1998), exposición a altas concentraciones de amonio (Mugnier y Justou, 2004) e infección con *V. alginolictus* (Hsieh *et al.*, 2008), entre otros.

El contenido de glucógeno en músculo no presentó diferencias significativas durante los retos agudos, pero si se observó un aumento durante todo el reto crónico, llegando a ser al final del reto de más del triple de su valor inicial. En el

caso del hepatopáncreas el glucógeno disminuyó en un 30% en ambos retos agudos (hipertermia e hipoxia) y llegó próximo al 50% en la respuesta crónica. Se sabe que en los crustáceos decápodos el glucógeno es la molécula de almacenamiento de los carbohidratos, y en hepatopáncreas es donde se acumula principalmente (Gibson y Barker, 1979; Loret, 1993), por lo cual se puede inferir que un incremento de carbohidratos en los tejidos es proveniente de la degradación de glucógeno almacenado en hepatopáncreas con el fin de satisfacer la demanda metabólica de sustrato en estos tejidos y además para proveer de glucosa a otros tejidos con una alta demanda de energía, como el corazón y sistema nervioso (Van Aardt, 1988). Mencionado lo anterior y de acuerdo con lo obtenido en contenido de carbohidratos totales, podemos observar que en efecto el hepatopáncreas está sirviendo como almacén de carbohidratos (principalmente glucógeno) transfiriéndolos a diferentes tejidos. Por lo tanto, en el caso del músculo los carbohidratos llegan a este tejido en forma de glucosa en la sangre, lo cual hace difícil observar diferencias a corto plazo en el contenido de glucógeno (ya que aun no se ha sintetizado esta molécula), y solo se observa un aumento a largo plazo.

Se observó una tendencia a aumentar la concentración de glucosa en hemolinfa en ambos retos (agudo y crónico) y para ambas variables (temperatura y oxígeno), sin mostrar diferencias significativas. Por lo general, se ha aceptado que hay un incremento de glucosa en hemolinfa proveniente de la movilización de glucógeno almacenado en músculo y hepatopáncreas con el fin de satisfacer la demanda metabólica de sustrato en tejidos (Van Aardt, 1988). En el presente estudio, la variación de los datos obtenidos no nos permite establecer una respuesta clara, sin embargo observamos una tendencia a aumentar en el contenido de glucosa, y tomando en cuenta los resultados para otras moléculas, podemos decir que aunque el contenido de glucosa aumente en la hemolinfa, probablemente no se alcanza a percibir el cambio registrado, debido a la transferencia de esta molécula hacia otros tejidos para su uso. En otros trabajos por el contrario se ha observado

que en situaciones de estrés a largo plazo hay un decremento en los niveles de glucosa al someter a los organismos ante perturbaciones como hipoxia moderada (Hagerman *et al.*, 1990) o temperaturas de 33°C (Pascual *et al.*, 2003b); por lo que las variaciones en los resultados de la movilización de reservas en diversos estudios, hacen difícil asumir un perfil metabólico estándar para la especie (Sánchez-Paz *et al.*, 2007).

En este estudio solo se encontraron diferencias en la concentración de lactato total en hemolinfa en el reto agudo de hipoxia. Los invertebrados marinos responden a condiciones de hipoxia mediante el uso de vías metabólicas alternas, donde el lactato es el producto final del metabolismo anaerobio (Hochachka *et al.*, 1992). En los resultados obtenidos se observa una disminución en el contenido de lactato en hemolinfa durante el reto de hipoxia, contrastando con la mayoría de los resultados obtenidos en otros estudios, sin embargo, se sabe que esto puede suceder debido a la existencia de dos tipos de hipoxia: la hipoxia ambiental, considerada como un descenso del nivel de oxígeno a niveles por debajo del nivel de saturación del oxígeno en el agua; y la hipoxia funcional o celular, referida como la concentración de oxígeno a la cual se observa un incremento de productos del metabolismo anaeróbico (Magallón-Servín, 2004). De acuerdo con lo anterior podemos decir que las condiciones de hipoxia para nuestro trabajo fueron de hipoxia ambiental, ya que la concentración de oxígeno de 2mg/L, no representa un evento extremo de disminución de oxígeno. Al igual que en este trabajo, ya se ha observado anteriormente que bajo condiciones de hipoxia ambiental moderada, algunas especies de crustáceos (como *Homarus vulgaris*) no presentan ningún efecto en el metabolismo, debido a que presentan estrategias para mantener su metabolismo aeróbico aún bajo dichas condiciones (Butler *et al.*, 1978).

El contenido de lípidos en el músculo presentó un incremento tanto para el reto agudo, como para el crónico para ambos factores. Sin embargo, este aumento sólo fue significativo para el reto agudo de oxígeno y en el reto crónico tanto por temperatura, como por oxígeno. Este comportamiento parece indicar que el músculo es un tejido que funciona como depósito de lípidos para los camarones y también debido a los resultados encontrados en triglicéridos, al parecer se almacenan en mayor proporción otras moléculas como los precursores hormonales y fosfolípidos (Gong *et al.*, 2004). En el caso de los triglicéridos, se observó un descenso de estos compuestos en el reto agudo de temperatura pero sin diferencias significativas. En ninguno de los otros retos se observó cambio en el contenido de triglicéridos. Esto parece indicar que estos compuestos están presentes en músculo, pero su papel no parece fundamental ante un estrés ambiental. En el hepatopáncreas, se presentó un incremento de lípidos y de triglicéridos en todos los retos. Este incremento fue significativo para todos a excepción del reto agudo de temperatura. Dado que el hepatopáncreas es un órgano de almacén, el hecho de que los lípidos y triglicéridos tiendan a incrementarse ante el estrés, mientras las proteínas y los carbohidratos se movilizan para otros órganos, sugiere que los organismos se preparan con reservas adicionales que sólo se utilizarán en casos más extremos, es decir, conservar la energía que representan los triglicéridos y aumentar el contenido de otros lípidos como los precursores hormonales, las lipoproteínas y los fosfolípidos, para su posterior utilización. La fuente de recuperación de estas sustancias se da a partir de la ingesta del alimento utilizado. En el caso de la hemolinfa los niveles de triglicéridos tendieron a disminuir de forma general en todas las respuestas, sin embargo no se presentaron diferencias significativas. Esto puede haber sucedido debido a que los triglicéridos son precursores de hormonas, por lo que su transporte hacia el hepatopáncreas para su almacenamiento pudo haber ocasionado esta tendencia.

En el presente trabajo disminuyeron los niveles en la concentración de colesterol en los tejidos de músculo y hepatopáncreas. En el caso del músculo se observó un contenido 20% menor tanto en el reto agudo de hipoxia como en el reto crónico de ambas variables. En el caso del hepatopáncreas fue mayor la disminución en el contenido de colesterol siendo de aproximadamente un 60% en el tratamiento agudo de temperatura y en el reto crónico. El colesterol participa en el transporte de lípidos mediante lipoproteínas y además es precursor de la vitamina D y de hormonas esteroidales, necesarias para la reproducción (Teshima, 1982; Cahu y Quazuguel, 1989). En el hepatopáncreas la mayor disminución en contenido de colesterol que en músculo, se puede atribuir a la respuesta hormonal ante un evento de estrés ambiental, donde este compuesto se manda desde este tejido para satisfacer las necesidades hormonales de todo el organismo.

Se observó una tendencia a disminuir en la concentración de carotenoides en hemolinfa y en músculo, observando diferencias significativas en el reto agudo de temperatura para la hemolinfa y en el reto agudo de hipoxia y crónico para el músculo. En el caso del hepatopáncreas aumentó entre 5 y 10 veces en el reto agudo de hipoxia y crónico de hipoxia e hipertermia. Algunos de los papeles biológicos y nutricionales de importancia que han sido atribuidos a los carotenoides como la astaxantina, entre otros, son su función como una provitamina A, sus fuertes propiedades antioxidantes (Miki, 1991), junto con un papel nutricional en la primera alimentación en dietas para acuicultura y en la fecundidad de organismos reproductores (Meyers *et al.*, 2000). Los carotenoides probablemente son utilizados por el hepatopáncreas para responder a los problemas relacionados con radicales libres debido a condiciones de hipoxia principalmente (Kurashige *et al.*, 1990).

EXPRESIÓN

En el presente estudio se encontraron formas de regulación de la expresión génica que están involucradas en una amplia variedad de procesos celulares metabólicos, sin embargo, las tendencias observadas tanto en los retos agudos como en el crónico hacen evidentes diferencias marcadas tanto entre los tipos de agentes estresantes, como entre la duración de la exposición.

Durante el reto agudo de temperatura se observaron modificaciones en rutas relacionadas con crecimiento y obtención de energía. Del total de genes utilizados para el microarreglo se pudieron identificar el 4.1% como reprimidos y el 6.4% como sobre-expresados, concordando con los porcentajes obtenidos en otros trabajos relacionados (Logan y Somero, 2010; Rathburn *et al.*, 2013). Las principales rutas reprimidas fueron organización de membrana, organización de cromosomas, organización de cromatina, respuesta inmune y actividad metaloendopeptidasa; y las sobre-expresadas fueron actividad transportadora del ion calcio a través de membrana con actividad ATPasa, unión de nucleótidos, unión del ion magnesio, crecimiento y glucólisis. Podemos observar una correlación entre los efectos de varias de estas rutas para afrontar el estrés, pues al disminuir la energía utilizada para la degradación proteica (actividad metaloendopeptidasa) y la organización de membrana, cromosomas y cromatina; tenemos más energía aparte de la obtenida de la glucólisis para la estabilidad de la célula (Logan y Somero, 2010). Sin embargo el costo resulta ser alto, debido a que se suprime la respuesta inmune y se promueve el uso del transporte de calcio con actividad ATPasa con la finalidad de obtener mayor energía, proceso que puede provocar activación de fosfolipasas y proteasas causando apoptosis celular, procesos también favorecidos por la falta de organización en la membrana (Storey y Storey, 2000).

En el caso del reto agudo de hipoxia se observó el incremento en genes relacionados con rutas de crecimiento, pero en el caso de las rutas suprimidas hubo mayor énfasis en disminuir el uso de energía y oxígeno. Se puede observar rutas que apoyan la regulación positiva de crecimiento como la síntesis de constituyentes estructurales del ribosoma y la ligadura de nucleótidos, haciendo énfasis en unión de RNA. La actividad oxidorreductasa que involucra donadores de oxígeno disminuyó, sugiriendo reducción en el uso de oxígeno en respuesta a los daños provocados por la hipoxia (Wu, 2002; Boutilier y Pierre, 2000). Cuatro de las rutas suprimidas se enfocan en disminuir el uso de energía en procesos metabólicos como modificación de cromatina, modificación de aminoácidos y de neurotransmisores; inclusive hay una disminución en degradación de lisina hasta acetil-CoA y carnitina, promoviendo también el aumento del proceso biosintético de ácidos grasos insaturados y el transporte mediado por vesículas debido a la falta de carnitina para su transporte (Li y Brouwer, 2009).

Al terminó del reto crónico se observó una reducción en el uso de energía mediante la supresión de varias rutas relacionadas con síntesis de proteínas y glucólisis; en el caso de estrés por temperatura aumentan rutas que utilizan obtención de energía usando aminoácidos o NAD; y en el de hipoxia aquellas que involucran compuestos orgánicos y la membrana mitocondrial. Existe claramente una disminución del uso de energía al suprimir la glucólisis en ambas condiciones de estrés, así como la síntesis proteica al reprimir la regulación de crecimiento, ribosoma, constituyente estructural del ribosoma en el caso de la temperatura; y regulación positiva de crecimiento, regulación positiva de la tasa de crecimiento, actividad helicasa de DNA y ribosoma en el caso de hipoxia, para conservar rutas más esenciales en funcionamiento (Lutz y Prentice, 2002; Rathburn *et al.*, 2013). En exposición a hipertermia los genes que se sobre-expresan influyen en el uso de NAD como cofactor para diversos procesos de óxido-reducción (dominio de unión NAD (P), actividad óxidorreductasa con donador CH-CH y aceptor NAD (P)), la degradación de proteínas (actividad endopeptidasa) y la biosíntesis de péptidos

no ribosomales para la obtención de energía alternativa o la rotación para el mejor aprovechamiento de ATP (Lutz y Prentice, 2002). Por otra parte en el caso de estrés por hipoxia aumentan su actividad rutas en obtención de energía por oxidación de compuestos orgánicos debido a que la glucólisis esta reprimida y aquellas involucradas en organización de membranas (focalización de proteínas hacia la membrana, organización interna de la membrana mitocondrial, importación de proteínas hacia el interior de la membrana mitocondrial) por el daño causado en el equilibrio osmótico y daño oxidativo del organismo debido a hipoxia (Storey y Storey, 2000).

RELACIONES ENTRE RESPUESTAS

La temperatura alta como estresor durante una exposición aguda, modifica el uso de energía en los camarones. Encontramos que en el reto agudo de temperatura, el aumento en el potencial de crecimiento y disminución en excreción de amonio están relacionados con la sobreexpresión de la glucólisis y la represión de la actividad metaloendopeptidasa (degradación de proteínas); y el incremento de carbohidratos, con una disminución en el almacén (glucógeno en hepatopáncreas), implicando entonces, que el incremento son monosacáridos que sirven de energía inmediata; lo cual tiene sentido al observar el aumento en la glucólisis. La disminución en la excreción de amonio, indica al igual que la represión de la actividad metaloendopeptidasa la disminución del uso de proteínas como fuente de energía, ya que tanto la degradación como el uso de proteínas o aminoácidos es metabólicamente más costoso. Sin embargo, esto también puede estar relacionado con la disminución en la tasa de ingestión, ya que los organismos al ingerir menos alimento necesitan utilizar de forma más eficiente la energía y no degradar compuestos que son clave para su metabolismo (como las enzimas) y al mismo tiempo tener combustibles metabólicos disponibles para su uso inmediato. Por otro lado, también se observó la relación entre la represión de la ruta de organización de membrana celular y la modificación del contenido de

lípidos y triglicéridos, indicando probablemente que son mantenidos en las membranas, debido al daño ocasionado por la temperatura, y utilizados para la formación de nuevas células como se explica a continuación. También existe la relación del uso de la energía libre indicada en el potencial de crecimiento, orientado hacia el crecimiento del organismo; al observar, un aumento en la ruta de regulación positiva de crecimiento (replicación celular), junto con otras intrínsecamente relacionadas, como son la unión de nucleótidos (ARN) y de Mg^{2+} (estabilizador de la estructura del ADN y ARN); y en todo caso la disminución de las rutas de organización de cromatina y cromosomas; para favorecer la replicación celular y hacer frente a la condición estresante de hipertermia; aunque, estas modificaciones resultan costosas para el organismo, pues la expresión relacionada con la respuesta de defensa (inmune) se ven reprimidas, haciendo al mismo tiempo a los organismos más susceptibles a enfermedades.

Durante la exposición aguda a hipoxia la tasa de ingestión y la tasa respiratoria disminuyen como una respuesta común a la deficiencia de oxígeno en el ambiente, lo cual provoca que el organismo organice una serie de cambios como los observados a nivel de expresión al reducir la actividad oxidorreductasa con donadores de dos átomos de oxígeno, ya que así se reduce el uso de oxígeno reduciendo la actividad de los donadores de oxígeno. Por otra parte, una reducción en el proceso metabólico celular de aminos biogénicas (neurotransmisores) y la modificación de aminoácidos, disminuye el uso de aminoácidos a nivel funcional, que puede relacionarse con su función a nivel estructural y energético, puesto que se disminuye la modificación de cromatina y se aumentan las rutas de replicación celular, unión de nucleótidos y constituyente estructural del ribosoma; significando que hay interés en el organismo por seguir creciendo. Lo anterior, también esta relacionado con las demás respuestas fisiológicas y bioquímicas, pues observamos que hay aumento en la excreción de amonio y una disminución de proteínas en el hepatopáncreas (uso energético), mientras en el músculo se mantiene la concentración de proteínas (crecimiento).

En las branquias, el reprimir la ruta de degradación de lisina, al ser éste un aminoácido clave para el transporte de lípidos, incrementa el transporte mediante vesículas para también aumentar el consumo de lípidos en la mitocondria; y además al ser un aminoácido cetogénico (se degrada a acetil-CoA) una menor degradación de lisina, provoca no generar acetil Co-A para su uso en el ciclo de Krebs, provocando la degradación de ácidos grasos hasta acetil-CoA y la necesidad en la expresión de biosíntesis de ácidos grasos insaturados, lo cual puede observarse en relación con la respuesta en contenido bioquímico por la disminución de lípidos en las branquias.

En el caso de la hipertermia durante el reto crónico se observó una doble respuesta, una estrategia de uso de energía debido al agotamiento por la exposición prolongada y otra de almacenamiento de combustibles metabólicos. Se observó una relación entre las respuestas fisiológicas, puesto que, como producto de una menor eficiencia de absorción y un aumento en el consumo de oxígeno, disminuye el potencial de crecimiento (energía libre); esto, también está relacionado con las respuestas a nivel de compuestos bioquímicos, ya que podemos observar la disminución de proteínas en hepatopáncreas y músculo, compuestos cuyas funciones son estructurales y de catálisis de reacciones, por lo que el déficit en la eficiencia de absorción puede deberse a la falta de las enzimas necesarias y el gasto energético que conlleva la degradación y absorción de nutrientes de la dieta; lo anterior, también relacionado con la expresión, ya que se incrementan las rutas de degradación de proteínas (actividad endopeptidasa) y las relacionadas con intermediarios en el metabolismo energético (biosíntesis de cofactores, el dominio de unión para NAD(P), actividad redox usando NAD(P)); lo cual, no solo indica la degradación de proteínas y el incremento de cofactores para mantener la eficiencia enzimática, sino que también, al tener coenzimas capaces de incluirse en la fosforilación oxidativa, se promueve el aumento en el uso de oxígeno justificando el aumento en la tasa respiratoria. Por otra parte, hay una relación clara entre respuestas en el almacenamiento de nutrientes para la

conservación de energía, ya que el aumento de carbohidratos y lípidos en hepatopáncreas y músculo, aumenta en la exposición prolongada una vez que se reprimen las rutas de glucólisis y de actividad fosfofructoquinasa, claves en el catabolismo de los carbohidratos.

En el caso de exposición a hipoxia crónica hay disminución en la expresión de rutas relacionadas con la generación y uso de energía. La glucólisis es un proceso importante para obtener energía, pero al estar reprimida, funciona como reserva energética ya que en lugar de degradar los carbohidratos estos tienden a ser almacenados y esto podemos observarlo al hacer la relación con la respuesta de contenido bioquímico ya que se almacenan carbohidratos en tejidos como las branquias y el músculo. Por otro lado, también en el caso de la expresión se hicieron cambios en la distribución de energía, ya que se conoce que la síntesis de proteínas y el crecimiento somático, son procesos metabólicos que consumen mucha energía, por lo que al reprimirlos la energía va hacia procesos como el desarrollo de genitales (fundamental para la preservación de la especie), la importación de proteínas hacia la membrana mitocondrial y la organización de la membrana mitocondrial; aparte de aumentar también la oxidación de compuestos orgánicos; y esto podemos relacionarlo directamente con las respuestas de contenido bioquímico implicadas en estas rutas, como el aumento de lípidos y triglicéridos en hepatopáncreas usados para la formación de hormonas y la disminución de lípidos en branquias, los cuales pueden ser usados como energía durante la exposición a hipoxia. Estas respuestas son importantes debido a que gracias a esto, la célula puede mantener la energía mediante la optimización de la obtención de ATP en la mitocondria aunque no se utilice la glucólisis, ayudando a mantener iguales las respuestas fisiológicas de tasa de ingestión, tasa respiratoria y potencial de crecimiento, pues no se necesita aumentar o disminuir la cantidad de oxígeno o alimento usado en el metabolismo, ya que el uso de energía es el mismo, pero se utiliza de diferente forma.

CONCLUSIONES

1. Los juveniles de camarón blanco tienen la capacidad de modificar sus tasas fisiológicas para compensar el estrés ambiental provocado.
2. Los cambios en los cambios ambientales provocan diferencias importantes en las tasas fisiológicas, observando una estrecha relación entre los cambios ambientales y el potencial de crecimiento de los organismos.
3. El estrés provocado fue subsanado por el uso de los combustibles metabólicos y las sustancias usadas en primer orden fueron las proteínas y posteriormente los carbohidratos, ambos obtenidos del músculo y el hepatopáncreas. En las branquias se recurrió al uso tanto de los carbohidratos como de lípidos.
4. Como una respuesta conservadora músculo y hepatopáncreas tendieron a almacenar lípidos; y el hepatopáncreas, particularmente almacena una mayor proporción de triglicéridos.
5. En la exposición hipertermia los juveniles mostraron un aumento en expresión para rutas de crecimiento y glucólisis en la exposición aguda, que son reprimidas cuando el estrés es sostenido a largo plazo.
6. Durante el reto agudo de hipoxia se redujo el uso de rutas que aumentan el uso de energía (modificación de cromatina, modificación de aminoácidos), para mantener aquellas rutas que apoyan la reparación celular (síntesis constituyentes del ribosoma, ligadura de nucleótidos).
7. En la exposición crónica de hipoxia, los organismos hacen uso de rutas para la reparación de membranas, suprimiendo rutas de regulación de crecimiento.
8. Se encontró que las respuestas fisiológicas, de contenido bioquímico y de expresión, se relacionan entre sí, formando una respuesta integral a nivel energético para hacer frente al estrés.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar un estudio integral de las proteínas y lípidos en los tejidos durante la exposición a estrés, para bucar establecer una correlación entre los diversos tipos de proteínas (como enzimas, gluco-proteínas y hemocianina) y lípidos (fosfolípidos, ácidos grasos insaturados, ente otros) involucrados en el metabolismo e interacción fisiológica de los camarones estresados por estos dos factores ambientales, para tener más indicadores de estrés.
- Contrastar los resultados de expresión obtenidos por los microarreglos heterólogos, con resultados de expresión de un microarreglo de *L. vannamei*.
- Se recomienda aplicar el uso de los resultados obtenidos en la genómica funcional junto con técnicas moleculares modernas (como el RNA de interferencia o qPCR, entre otros), a fin de observar cambios más finos en la expresión génica, para incursionar en el uso de nuevas herramientas que sirvan de apoyo para la industria del camarón.
- En los estanques de cultivo se recomienda mantener niveles de oxígeno por arriba de 2 mgO₂/L y hacer recambios para mantener la temperatura por debajo de 30°C.

BIBLIOGRAFÍA

Ahuejote-Sandoval, M. 2004. Estrés oxidativo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en respuesta a hipoxia y reoxigenación. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, 89 pág.

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

Armitage, K.B. y Wall, T.J. 1982. The effect of body size, starvation and temperature acclimation on oxygen consumption of the crayfish *Orconectes nais*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73A (1), 63-68.

Astete-Espinoza L.P., Garrido C.F., Cáceres, C.W. 2010 Repuestas fisiológicas de *Neotrypaea uncinata* (Decapoda: Thalassinidea) a la hipoxia y al parasitismo por *Ionella agassizi* (Isopoda: Epicaridea) *Revista de biología marina y oceanografía*. Volumen 45, No. 3: 423-431.

Barclay, M.C., Dall, W., Smith, D.M. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68, 229–244.

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

Bauchau, A.G. 1981. Crustaceans. In: Ratcliffe N.A. and Rowley, A.F. (Eds). Invertebrate blood cells. Academic Press, London and New York, 385-420.

Bayne B.L. 1976. Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press.

Bernabé, G. 1991. Acuicultura. Vol. 1. Ediciones Omega. España. 478 pp.
Blanchard M, Gros P. 1993. Estimation of matter fluxes generated by filter-feeding bivalves in the intertidal area of the Bay of Saint-Brieuc (Western Channel). Oceanol. Acta 16:5-6.

Boutillier, R. y Pierre, J. 2000. Surviving hypoxia without really dying. Comparative Biochemistry and Physiology. 126 A: 481-490.

Boyd, C.C. y Watten, B.J. 1989. Aeration systems in aquaculture. Revista de Acuicultura Científica. 1(3): 425-472.

Bray, W.A., Lawrence, A.L., Lester, L.J. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various level of total dietary lipids. J. World Aquaculture Soc. 21:41-52.

Bridges C.R. y Brand, A.R. 1980. Oxygen consumption and oxygen-independence in marine crustaceans. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2, 133-141.

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

Cahu, C. y Quazuguel, P. 1989. Lipid metabolism of *Penaeus vannamei* broodstock: influence of dietary lipids. *Aquaculture Europe*. 10:45-46.

Cameron, J.N. y Magnum, C.P. 1973. Environmental adaptations of respiratory system: Ventilation, circulation and oxygen transport. In: F.J. Vernberg & W.B. Vernberg, (Eds) *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York. 8: 43-63.

Carreño-Mejía, Atzín. 2009. Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ceballos-Vázquez, B.P., Rosas, C., Racotta, I., 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 228, 141–151.

Chen, J.C. y Lai, S.H. 1993. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 165:161-170.

Chen, J.C., Chen, C.T., Cheng, S.Y. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid level in the hemolymph of *Penaeus*

monodon exposed at different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. Mar. Ecol. Prog. Ser. 110:85-94.

Chen, J.C. y Lin, C.Y. 1995. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. Aquaculture, 136:243-255.

Chen, J. y Kou, T. 1996. Effect of temperature on oxygen consumption and nitrogenous excretion of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. 145: 295-303.

Conover, R.J. 1966. Assimilation of organic matter by zooplankton. Limnology and Oceanography. 11:338-345.

Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., Staples, D.J. 1990. The biology of the Penaeidae. In: Blaxter J.H.S. & Southward A.J. (Eds) Advances in Marine Biology. Academic Press, London, 27: 1-489.

D'Abramo, L.R. 1997. Triacylglycerols and Fatty Acids. In: Advances in World Aquaculture, Vol. 6. Crustacean Nutrition. Editors: D'Abramo, L. R., Conklin, L. R., Akiyama, D. M., (Eds.) World Aquaculture Society. 587.

De la Vega, Enrique, Hall, Michael R., Wilson, Kate J., Reverter, Antonio, Woods, Rick G., Degnan, Bernard M. 2007. Stress-induced gene expression profiling in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Physiol Genomics 31: 126–138.

Ferron, A. y Leggett, W.C. 1994. An Appraisal of Condition Measures for Marine Fish Larvae. In: *Advances in Marine Biology* 30: 217-303.

Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.

Gerhardt, H.V. 1980. Nitrogen excretion by juvenile prawn *Penaeus indicus* Milde Edwards oat various temperatures. *S. Afr. J. Sci.* 76:39-40.

Gibson, R. y Barker, P.L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanograp. Mar.Biol. Ann. Rev.* 17: 285-346.

Gong, H., Jiang, D., Lawrence, A., González-Félix, M., Pérez-Velázquez, M. 2004. Nuevos Avances en el Estudio de Fosfolípidos Nutrimientales para Camarón. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* 16-19.

Hall, M.R. y Van Ham, E.H. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquaculture Soc.*, Volume 29, 290-299.

Hernández, R.M. y Díaz, H.F. 1995. Interacción de la temperatura y la salinidad sobre la excreción de amonio y osmorregulación en *Penaeus aztecus* (Crustácea, Penaeidae). *Criba. J. Sci.* 31:284-288.

Hopkins, J.S., Stokes, A.D., Browdy, C.L., Sandifer, P.A. 1991. The relationships between feeding rate paddle-wheel aeration rate and expected dawn dissolved oxygen in intensive shrimp ponds. *Aquaculture Engineering*. 10: 281-290.

Jacobs, N.J. y VanDenmark, P.J. 1960. The purification and properties of the α -glycerophosphate-oxidizing enzyme of *Streptococcus faecalis* 10C1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 88, Issue 2, 250-255.

Jiang, D.H., Lawrence, A.L. Neill, W.H., Gong, H. 2000. Effects of temperatura and salinity on nitrogen excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253:193-209.

Jiang, H., Li, F., Xie, Y., Huang, B., Zhang, J., Zhang, C., Li, S., Xiang, J. 2009. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics* 9: 3353–3367.

Johnson, P.T. 1980. Histolgy of the blue crab, *Callinectes sapidus*. A model for the Decapoda. Praeger, New York. 440.

Kinne, O. 1990. Temperature, animals, invertebrates. *Marine Ecology Vol. 1: Environmental factors, Part II*. Wiley Interscience, London. 407-514.

Kurmaly, K., Yule, A.B., Jones, D.A., 1989a. Effects of body size and temperature on the metabolic rate of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Marine Bilogy* 103:25-30.

Kurmaly, K., Yule, A.B., Jones, D A., 1989b. An energy budget for the larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture* 81:13-25.

Lee, W. y Chen, J. 2004. Nitrogenous excretion and arginase specific activity of kuruma shrimp *Marsopenaeus japonicus* exposed to elevated ambient nitrite. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 308: 103-111.

Lemos, D. y Phan, V.N. 2001. Energy partitioning ingtro growth, respiration, excretion and exuvia during larval development of the shrimp *Farfantapenaeus paulensis*. *Aquaculture* 199:131-134.

Lemos, D., Phan, V.N., Alvarez, G. 2001. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantapenaeus paulensis* Pérez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume 261, Issue 1, 55-74.

Li, S., Xiaotao, L., Zhuojia, L., Zhongneng, X. 2006. Feeding of effects on metabolism of white Pacific shrimp (*Litopenaues vannamei*). *Journal of tropical oceanography*. 25: 44-48.

Li, Erchao, Chen, Liqiao, Zeng, Ceng, Chen, Xuemin, Yu, Na, Lai, Qiuming, Qin, Jian G. 2007. Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities, *Aquaculture*, Volume 265, Issues 1–4, 385-390.

Li, T.D. y Brouwer, M. 2009. Gene expression profile of grass shrimp *Palaemonetes pugio* exposed to chronic hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. D* 4, 196–208.

Lim, C. y Akiyama, D.M. 1995. Nutrients requirements of penaeid shrimp. In: *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*, C.e. Lim y d. J. Sessa. Ed. AOAC Press. Champaign, Ill. 60 – 73.

Logan, Cheryl A. y Somero, George N. 2010. Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). *J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R843–R852.

Loret, S. 1990. Evaluation de l'importance relative des hemocytes et des cellules de la glande digestive d'un crustacé decapode, dans la mise en réserve et la liberation du glucose. *Namur, Fr.* 124.

Lucas, A. 1993. *Bioenergética Des Animaux Aquatiques*. Masson, Paris. Pp 1-176.

Lucien-Brun, H. 1989. *Guía para la producción de camarón en el Ecuador*. 1a. Edición. 58 pp.

Lutz, P.L. y Prentice, H.M. 2002. Sensing and Responding to Hypoxia, Molecular and Physiological Mechanisms. *Integrative and Comparative Physiology*. 42: 463-468.

Magallón-Servin, Paola. 2004. Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931. Tesis de Maestría. CIBNOR. 133. p

Martínez-Córdova, L.R. 1999. Cultivo de camarones penéidos: Principios y prácticas. Edit. Editor. 283.

Martínez-Córdova L., Villareal, C.H. & Cortés J.E. 1999. Capítulo 1: Biología del camarón. Cultivo de camarones penéidos, principios y prácticas. AGT Editor S.A., México, D.F., 1-20.

Madenjian, C. M., Rogers, G. L., Fast, A. W. 1987. Predicting night-time dissolved oxygen loss in prawn ponds of Hawaii: Part I. Evaluation of traditional methods. *Aquaculture Engineering* 6: 191-208.

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

Meyers, S. P. .2000. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. pp 473-491 pp. En: Civera- Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

Millamena, Oseni M. y Pascual, Felicitas P. 1990. Tissue Lipid Content and Fatty Acid Composition of *Penaeus monodon* Fabricius Broodstock from the Wild, Journal of the World Aquaculture Society, Volume 21, Issue 2, 116-121.

Molina-Poveda, C. y Morales, M.E., 2004. Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquac. Res. 35, 1158–1165.

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

Nachtigall, Aline Manke. Extração, Saponificação e Atividade Antioxidante de Luteína Obtida de Flores de *Tagetes patula* e *Calendula officinalis*. Tesis (Doctor Scientiae). Viçosa Minas Gerais, Brasil Universidade Federal de Viçosa, 2007.

Neill, W. 1989. Effects of temperature and oxygen on biology of aquatic organisms: implications for aquaculture. J. World Aquaculture Soc., 20-54.

Nelson, D.L. y Cox, Michael M. 2005. Principios de bioquímica, Lehninger. 4ª edición. Omega. Barcelona España.

New, M.B. 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. Aquaculture 9, 101–144.

Newman S.G. 2000. Management and prevention of stress in aquaculture with a focus on farmed shrimp. Fourth Latin American Aquaculture Congress and Seafood Trade Show, Oct 25-28, <http://www.aqua-in-tech.com>

Newsholme, F.S. y Leech, A.R. 1983. Bioquímica médica. Ed. Interamericana, México.

Ocampo V. L. 1994. Evaluación del efecto de la temperatura y el peso en el consumo de oxígeno del camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes 1900). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, 63.

Oliveira, G.T., y Da Silva, R.S.M. 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comparative Biochemistry and Physiology* 127B: 375–381.

Oliveira, G.T., Rossi, I.C.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Marine Biology* 139(2): 335–342.

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

Palacios, E., Ibarra, A.M., Ramírez, J.L., Portillo, G., Racotta, I.S. 1998. Biochemical composition of eggs and nauplii in White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in relation to the physiological condition of spawners in a commercial hatchery, *Aquaculture Research*, Volume 29, Issue 3, 183–189.

Palacios, E., Pérez-Rostro, C.I., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M., Racotta, I.S. 1999. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth, *Aquaculture*, Volume 171, Issues 3–4, 309-321.

Palacios, E., Ibarra, A.M., Racotta, I.S. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock, *Aquaculture*, Volume 185, Issues 3-4, 353-371.

Paschke, Kurt, Cumillaf, J.P., Loyola, S., Gebauer, P., Urbina, M., Chimal, M.E., Pascual, C., Rosas, C. Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology, and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae) *Marine Biology*, Volume 157, Issue 1, 7-18.

Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C. 2003a. Manual de métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones penéidos. Laboratorio de Ecología y Biología Marina experimental, Fac. De Ciencias UNAM, Cd. Del Carmen, Campeche.

Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2003b. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature; *Aquaculture*, Volume 218, Issues 1-4, 637-650.

Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gabriela, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E., Rosas, C. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture*, Volume 251, Issues 2-4, 416-429.

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

Pérez-Jar, L., Rodríguez-Ramos, T., Ramos L., Guerrero-Borrego, Y., Racotta, I.S. 2006. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus shmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*, Volume 252, 591-597.

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

Pillai, B.R. y Diwan, A.D. 2002. Effect of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus monoceros*. J. Crust. Biol. 22(1): 45-52

Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A. y Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone 1931. Aquaculture 157, 107-115.

Prosser, L. 1991. Environmental and metabolic animal physiology, New York, Wiley-Liss.

Puente-Carreón, Eleonora. 2009. Respuestas fisiológicas de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura. Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN. 175 p.

Quinn, Nicole L., McGowan, Colin R., Cooper, Glenn A., Koop, Ben F., and Davidson, William S. 2011. Ribosomal genes and heat shock proteins as putative markers for chronic, sublethal heat stress in Arctic charr: applications for aquaculture and wild fish. Physiol Genomics 43: 1056–1064.

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

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

Racotta, I.S., Palacios, E., Mendez, L. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mar. Fresh. Behavior Physiology*. Volume 35, 269-275.

Rathburn, Charles K., Sharp, Natasha J., Ryan, James C., Neely, Marion G., Cook, Matthew, Chapman, Robert W., Burnett, Louis E., and Burnett, Karen G. 2013. Transcriptomic responses of juvenile Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to hypoxia and hypercapnic hypoxia. *Physiol Genomics* 45: 794–807.

Re, A.D., Díaz, F. Sierra, E., Gómez-Jiménez, S. 2004. Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora de *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) expuesto a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. *Cien. Mar.* 30(3):443-453.

Roe, J.H., Bailey, J.M., Gray, R.R., Robinson J.N. 1961. Complete Removal of Glycogen from Tissues by Extraction with Cold Trichloroacetic Acid Solution. *The Journal of Biological Chemistry.* 236(5):1244-1246.

Rosas, C., Martínez, E., Gaxiola, G., Díaz, E., Brito, R., Soto, L. 1998. Effect of dissolved oxygen on the energy balance and survival of *Penaeus setiferus* juveniles. *Mar Ecol. Prog. Ser.* 174:67–75.

Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A., Soto, L.A. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 234(1): 41-57.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C., Van Wormhoudt, A. 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. J. Exp. Mar. Biol. Endocrin. 249, 181-198.

Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Van Wormhoudt, A. 2001. Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). Aquaculture Research, Volume 32, Issue 7, 531-547.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., Van Wormhoudt, A. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 268, 47-67.

Rosas, C., Sánchez, A., Chimal, M.E., Brito, R. 2003. Manual de métodos para la evaluación del Balance Energético en crustáceos. JORNADAS IBEROAMERICANAS DE NUTRICIÓN EN ACUICULTURA. Centro de Formación de la Cooperación Española en Cartagena de Indias. Colombia, 7 a 11 de julio del 2003. 43 p.

Rosas, C., Cooper, E.L., Pascual, C., Britto, R., Gelabert, R., Moreno, T., Miranda, G., Sánchez, A. 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild population (Crustacean, Penaeidae).

Sánchez, A., Rosas, C., Escobar, E., Soto, L.A. 1991. Skeleton weight free oxygen consumption related to adaptation to environment and habits of six crustacean species. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 69-73.

Sánchez, A., Pascual, P., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation; *Aquaculture*, Volume 198, Issues 1-2, 2001, 13-28.

Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Hernández-López, J., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Volume 340, Issue 2, 184-193.

Scarpa, J. y Vaughan, D. 1998. Culture of marine shrimp *Penaeus vannamei* in fresh water. Book of abstracts of the World Aquaculture Society Meeting. Nevada, U.S.A. 473.

Seidman, E.R. y Lawrence, A.L. 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different and dissolved oxygen levels. *J. World Maricul. Soc.* 16: 333-346.

Selye, H. 1956. The stress of life. McGraw-Hill, New York.

Shiau, S.Y. y Peng, C.Y. 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn, *Penaeus monodon*, reared in seawater. *Aquaculture* 101:241-250.

Shigueno, K. 1976. Shrimp Culture in Japan. Association for International Technical Promotion, Tokyo, 153.

Sicard, G.M.T. 2006. Efecto de la oscilación térmica en la fisiología de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835). Tesis de Doctorado. U.A.N.L. 198 p.

Silva, S.C. y Regnault, M. 1980. Variations of oxygen consumption in the shrimp *Palaemon serratus* during the intermolt cycle. *Cah. Biol. Mar.* 121 (3): 279 – 286.

Silva-Castiglioni, D., Oliveira, G.T., Buckup, L. 2010. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hipoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 156: 436–444

Smith, D. y Dall, W. 1985. Molt staging the tiger prawn *Penaeus sculentus*. In: Rothlisberg, P.C., Hill, B., Staple, D. (Eds.), *Second Australian national seminar*, Queensland, 85-93.

Soñanez-Organis, J.G., Peregrino-Uriarte, A.B., Gómez-Jiménez, S., López-Zavala, A., Forman, H.J., Yepiz-Plascencia, G. 2009. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia, *Comp. Biochem. Physiol. C* 150: 395-405.

Soñanez-Organis, J.G., Racotta, I.S., Yepiz-Plascencia, G. 2010. Silencing of the Hypoxia Inducible Factor 1 -HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 393: 51-58

Spees, J.L., Chang Sharon, A., Snyder Mark, J., Chang Ernest, S. 2002. Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: Equivalent temperature shifts elicit unique gene expressions patterns for molecular chaperones and polyubiquitin, *Cell Stress Chaperones*; 7(1): 97-106.

Storey, K.B. y Storey, J.M. 2000. *Cell and Molecular Responses to Stress. Volume 1: Environmental Stressors and Gene Responses.* Elsevier Science, Amsterdam, 303 p.

Teshima, S. 1982. Sterol metabolism. In: *Proceedings of the 2 International conference on Aquaculture Nutrition*, Edited By G.D. Pruder, C.J. Langdon and D. E. Conklin. Louisiana State Univ. Baton Rouge. 216p.

Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *Journal of clinical pathology.* 22, 246

Van Aardt, W.J. 1988. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab *Potamonautes warrenicalma*, during anoxia and subsequent recovery. *Com. Biochem. Physiol. Part A: Physiology*, Volume 9, 299-304.

van der Meer, D.L.M., van den Thillart, G., Witte, F., de Bakker, M., Besser, J., Richardson, M.K., Spaink, H.P., Leito, J.T.D., Bagowski, C.P. 2005. Gene expression profiling of the long-term adaptive response to hypoxia in the gills of adult zebrafish. *American Journal of Physiology—Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 289:R1512–R1519.

Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. 191, 13-21.

Villarreal, H. y Ocampo, L. 1993. Effect of size and temperature on the oxygen consumption of the brown shrimp *Penaeus californiensis* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A(1):103-107.

Villarreal, H., Hinojosa, P., Naranjo, J. 1994. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus californiensis* postlarvae. *Comp. Bioch. Physiol.* 106A (1):103-107.

Warren, C.E. y Davis, G.E. 1967. Laboratory studies on the feeding, bioenergetics and growth of fish. 175-214p. En: Gerking, S.D. *The Biological Basis of Freshwater Fish Production*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Wickins, J. F. 1976. Prawn biology and culture. *Oceanography Marine Annual Review* 14: 435-507.

Wolvekamp, N.R y Waterman, T.H. 1960. Respiration In: *The Physiology of Crustacea*. Academic Press, New York, 670 pp.

Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J. 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation, *Aquaculture*, Volume 198, Issues 3–4, 307-323.

Wu, R.S. 2002. Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin* 45: 35 – 45.

Zacarías-Soto, M.R. 1997. Histología del estómago, corazón, hígado y riñón de *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindacher, 1869), y sus modificaciones ante situaciones de estrés crónico. Tesis de posgrado. U.A.B.C.S. La Paz, B.C.S. México 74 p.

Zhou, M., Wang, An-Li, Xian, Jian-An. 2011. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Effects of continuous cold stress. *Aquaculture*, Volume 317, 182–186.