



Programa de Estudios de Posgrado

Evaluación de moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales

(Orientación en: Biotecnología)

p r e s e n t a

Paola Magallón Servín

La Paz, B. C. S., Octubre 2004

**Tesis de Maestría en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los
Recursos naturales con Orientación en Biotecnología.**

Paola Magallón Servín

Comité Tutorial y Evaluador

Director de tesis: Dr. Jorge Hernández López

Co-tutor: Dra. Teresa Gollas Galván

Co-tutor: Dra. Tania Zenteno Savín

Comisión Revisora de Tesis.

Dr. Jorge Hernández López

Dra. Teresa Gollas Galván

Dra. Tania Zenteno Savín

Miembros del Jurado de Examen.

Dr. Jorge Hernández López

Dra. Teresa Gollas Galván

Dra. Tania Zenteno Savín

Suplente: Dr. Ricardo Pérez

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización del posgrado.

Al programa de posgrado y al CIBNOR por brindar su apoyo y las instalaciones necesarias para la realización de este trabajo.

A mi director de Tesis el Dr. Jorge Hernández López por su apoyo y amistad para la realización de este trabajo, así como a mis asesores la Dra. Teresa Gollas Galván (mil gracias Tere) y la Dra. Tania Zenteno Savín, por la revisión de este trabajo.

Al Biol. Francisco Javier Magallón Barajas, por haber sido pieza clave en la realización de este trabajo, desde el diseño experimental hasta la culminación de este.

Al Biol. Guillermo Portillo Clark por su enorme esfuerzo para la realización de este trabajo, por su gran amistad y apoyo fundamental, ya que con su paciencia y su dedicación los experimentos funcionaron.

Al Biol. Daniel Coronado Molina por su paciencia y cariño para enseñarme las técnicas necesarias para la realización de este trabajo, Dani gracias por tu amistad.

Al equipo de Estanquería: Mayra Vargas, Jesús Aguilar y el Güero.

Al Laboratorio de Bioquímica Fisiológica (en especial al M.C. Roberto Hernández) por su apoyo para poder realizar los análisis de este trabajo.

Al Laboratorio de Bioensayos y a Pablo Monsalvo, por todo su esfuerzo para apoyar el trabajo experimental.

Al Laboratorio de Histología e Histoquímica (M.C. Carmen Rodríguez) por el apoyo brindado.

Al Laboratorio de Microscopia Electrónica, Ariel gracias por tu paciencia y ganas de hacer cosas nuevas.

A todos los que participaron, sobre todo por su gran amistad y solidaridad, este trabajo se debe al equipo maravilla: Francisco, Memo, Ciro, Llumi, Karina y Rosalía. Gracias simplemente este trabajo no hubiera sido sin ustedes.

También agradezco este trabajo a todas aquellas personas que me dieron ánimos, que me apoyaron y que siempre tuvieron una palabra de aliento para que siguiera trabajando, mil gracias: Kate, Osvelia, Betty, Claudia, Cony, Bere, Normichi, Alice, Lili, Alex, Llumi, Martuchis, Mirianguiña, Jessy, Eduardo, Talpa, Alfredin, Memito, Anni, Tony, Dr. Lebsky, Ann, Dany, Nico, Laura, Gina y Taylor, Minerva, Zulema, Betty y Mario.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia.

A mi padre, mi mentor y gran maestro de paciencia.

A mi madre, mi mejor amiga y una gran mujer, gracias Má.

*A Javi y a Dani, sin ustedes mi vida seria gris
y nunca hubiera sabido lo que es el amor de hermanos, este trabajo es por ustedes.*

A mi mamá Callita por siempre apoyarme.

A mi mama Rafita por siempre hacerme sentir especial.

A mis abuelos, a mi abue y a mi mamá Locha, esto es por ti.

A las ñoñas por ser una parte importante de mi vida, las quiero mucho.

A mis comadres por estar conmigo y darme ánimos siempre!

A ti Kate por ser una inspiración y porque siempre me has demostrado tu amor y cariño.

A ti Daniel por ser mi mejor amigo, mi cómplice y mi compañero, te amo.

Índice

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras.....	v
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	
2.1 <u>Sistema inmune del camarón.....</u>	3
2.1.2 Respuesta celular del sistema inmune.....	3
2.1.2 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	5
2.1.3 Componentes humorales del sistema inmune.....	9
2.1.4 El sistema de la fenoloxidasa en camarón.....	12
2.1.5 Regulación del sistema de la proFO.....	16
2.2 <u>Efecto de la hipoxia y otras variables ambientales en el sistema inmune.....</u>	17
3. Justificación.....	22
4. Objetivos.....	23
4.1 Objetivo general	
4.2 Objetivos específicos	
5. Hipótesis.....	24
5.1 Hipótesis general	
5.2 Hipótesis específicas	
6. Materiales y Métodos.....	
<u>6.1 Experimento.....</u>	25
Obtención de los organismos y aclimatación.....	25
Diseño experimental.....	26
<u>6.2 Análisis de las muestras biológicas.....</u>	28
6.2.1 Toma de Muestras.....	28
6.2.2 Análisis de Muestras.....	28
<u>6.3 Análisis Muestras de Agua.....</u>	31
<u>6.4. Análisis Estadísticos.....</u>	31
7. Resultados	
7.1 <u>Comportamiento de los organismos durante el experimento.....</u>	32
7.2 <u>Variables fisicoquímicas y consumo de oxígeno.....</u>	33
7.3 <u>Variables fisiológicas en hemolinfa de camarón.....</u>	40
7.3.1 Niveles de ácido láctico en hemolinfa.....	40
7.3.2 Niveles de glucosa en hemolinfa.....	42
7.3.3 Niveles de colesterol en hemolinfa.....	46
7.3.4 Niveles de proteína soluble en hemolinfa.....	47
7.4 <u>VARIABLES ASOCIADAS AL SISTEMA INMUNE DEL CAMARÓN.....</u>	48
7.4.1 Actividad de la fenoloxidasa total (FO Tot).....	48
7.4.2 Actividad de la fenoloxidasa (FO).....	49
7.4.3 Actividad de la proFenoloxidasa (proFO).....	51

7.4.4 Actividad de α 2-Macroglobulina.....	53
7.4.5 Conteo total de hemocitos (CTH).....	55
7.4.6 Actividad de lisozima.....	57
7.4.7 Nitritos y nitratos en hemolinfa	
7.4.7.1 Nitritos en hemolinfa.....	58
7.4.7.2 Nitratos en hemolinfa.....	61
8. Discusión	
8.1 Diseño experimental, ejercicio e hipoxia.....	63
8.2 Consumo de oxígeno y comportamiento de los organismos.....	67
8.3 Variables fisicoquímicas.....	68
8.4 Variables fisiológicas en hemolinfa de camarón.....	73
8.5 Variables inmunológicas.....	80
9. Conclusiones	97
10. Bibliografía	99
Anexo	118

Resumen

La acuicultura de camarón es afectada por las enfermedades, las cuales provocan pérdidas económicas para esta actividad. Se sabe que las condiciones ambientales, los patógenos y la condición nutricional afectan el sistema inmune en los peneidos. En este trabajo *Litopenaeus vannamei* fue sometido a diferentes niveles de oxígeno (hipoxia aguda) y normoxia (<5 mg O₂/L) para entender como algunas variables inmunes como el sistema proFO, α 2M (α 2-Macroglobulina), lisozima, la actividad de la NOS (Oxido nítrico sintetasa) y el CTH (cuenta total de hemocitos) son modificados bajo estas condiciones. Después de la aclimatación (28°C, 35‰, pH 8), 200 organismos fueron sometidos a ejercicio en un tanque de 800L por 2 h. Después de este tratamiento éstos fueron expuestos a condiciones de hipoxia aguda y normoxia. Cuando el oxígeno alcanzó 4, 3, 2, 1, 0.5, y >0.5 mgO₂/L los organismos fueron muestreados, los controles fueron obtenidos de los organismos no ejercitados, ejercitados y en normoxia. A cada nivel de oxígeno la temperatura, pH, salinidad, amonio, urea, nitritos y nitratos fueron medidos. Todos los organismos fueron sangrados para medir lactato, glucosa, proteína, colesterol, y la actividad de FO (fenoloxidasa), proFO (proFenoloxidasa) y FO Tot (Fenoloxidasa Total), α 2M, y NO₂/NO₃ como reflejo de la actividad de la NOS en hemolinfa. Aunque los niveles de la proteína y el colesterol no fueron afectados por la hipoxia y el ejercicio, los resultados mostraron que cuando el oxígeno se encuentra por debajo de 0.5 mg O₂/L el lactato, la glucosa, la actividad de FO, proFO, FO Tot, lisozima y el CTH son reducidos. En este punto el lactato y la glucosa alcanzaron el máximo nivel causado por la activación del metabolismo anaeróbico. Bajo esta condición de déficit energético la actividad de la FO, proFO, FO Tot, lisozima y el CTH son reducidos. La actividad inhibitoria de la α 2M fue modificada por el ejercicio y por la hipoxia con la posibilidad de que esta macroglobulina participe en el metabolismo proteico, bajo estas condiciones. Finalmente, los niveles de NO₂/NO₃ en la hemolinfa no fueron modificados por la hipoxia, pero sí por el ejercicio, implicando que la actividad de la NOS se encuentra involucrada en la regulación neuronal y cardiovascular. En conclusión, algunos parámetros del sistema inmune de *L. vannamei* son afectados por la hipoxia y por el ejercicio, ambos causantes de estrés energético en estos organismos.

Palabras clave: sistema inmune, hipoxia, *Litopenaeus vannamei*.

Abstract

Shrimp aquaculture is affected by diseases that cause economic losses. It is well known that environmental conditions, pathogens and nutritional status affect the immune system of penaeids. In this work *Litopenaeus vannamei* was submitted to different levels of oxygen (acute hypoxia) and normoxia (<5 mg O₂/L) to understand how some immune variables, such as proPO system, α 2M (α 2-Macroglobulin), lysozyme, NOS (Nitric oxide synthase) and THC are changed under these conditions. After an acclimation period (28°C, 35‰, pH 8), 200 organisms were submitted to exercise in an 800 L tank for 2 h. After this treatment they were exposed to acute hypoxic and normoxic conditions. When the oxygen reached 4, 3, 2, 1, 0.5, and >0.5 mg O₂/L the organisms were sampled, controls were obtained from non exercised organisms, exercised and under normoxia. At each level oxygen, temperature, pH, salinity, ammonia, urea, nitrites and nitrates were measured inside each tank. All the organisms were bled to measure lactate, glucose, protein, cholesterol, activity of Tot PO, PO proPO, α 2M, lysozyme, and NO₂/NO₃ as an indicator of NOS activity on haemolymph. Although protein and cholesterol levels were neither affected by hypoxia nor exercise, the results showed that the lactate, glucose, Tot PO, PO, proPO activity, lysozyme and CTH are reduced when dissolved oxygen is below 0.5 mg O₂/L. At this point lactate and glucose reached the maximum level caused by the activation of the anaerobic pathways. Under this energy deficit condition the activity of TotPO, PO, lysozyme and THC were reduced. The inhibitory activity of α 2M was modified by exercise and by hypoxia with the possibility that this macroglobulin is participating in the protein metabolism, under these conditions. Finally the levels of NO₂/NO₃ on haemolymph were not changed by hypoxia but they were by the exercise suggesting that NOS activity is involved in neuronal and cardiovascular regulation. In conclusion, some parameters of the *L. vannamei* immune system are affected by hypoxia and exercise, both causing energetic stress in the organisms.

Key words: immune system, hypoxia, *Litopenaeus vannamei*.

Lista de Figuras

Figura 1. Niveles de oxígeno disuelto dentro de los tanques de exposición (N, CA, H, RH) durante los experimentos.	34
Figura 2. Consumo de oxígeno en los tanques de hipoxia (H y RH).	35
Figura 3. Nivel de pH en los diferentes tanques (N, CA, H, RH) durante el experimento.	36
Figura 4. Temperatura del agua en los diferentes tanques (N, CA, H, RH) durante el experimento.	36
Figura 5. Concentración de urea ($\mu\text{g/L}$) en los tanques N y H.	37
Figura 6. Concentración de amonio (mg/L) en los tanques N, H y CA.	38
Figura 7. Concentración de nitritos ($\mu\text{M/L}$) en la tina de aclimatación (grupo C), ejercicio (grupo E) y en los tanques N, CA y H.	39
Figura 8. Concentración de nitratos ($\mu\text{M/L}$) en la tina de aclimatación (grupo C), ejercicio (grupo E) y en los tanques N, CA y H.	40
Figura 9. Nivel de ácido láctico en hemolinfa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque H).	42
Figura 10. Nivel de ácido láctico en hemolinfa en grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque RH).	42
Figura 11. Nivel de glucosa (mg/dL) en hemolinfa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque H).	45
Figura 12. Nivel de glucosa (mg/dL) en hemolinfa en grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque RH).	45
Figura 13. Nivel de ácido láctico (Lac) y glucosa (Glu) en mg/dL en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tanques N, H y RH.	46
Figura 14. Nivel de Colesterol (mg/dL) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia.	47
Figura 15. Nivel de Proteína (mg/mL) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia.	48
Figura 16. Actividad de Fenoloxidasa Total en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia.	49
Figura 17. Actividad de Fenoloxidasa Total en el grupo control (C), en el grupo	50

ejercicio (E) y en los organismos de la J6 y libres de los tratamientos de normoxia e hipoxia.

Figura 18. Actividad de Fenoloxidasa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. 51

Figura 19. Actividad de Fenoloxidasa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los organismos de la J6 y libres de los tratamientos de normoxia e hipoxia. 52

Figura 20. Actividad proFenoloxidasa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. 53

Figura 21. Actividad de proFenoloxidasa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los organismos de la J6 y libres de los tratamientos de normoxia e hipoxia. 54

Figura 22. Actividad de la α 2-Macroglobulina (μ g de Tripsina/ α 2M) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. 55

Figura 23a. Conteo Total de Hemocitos ($\text{cel} \times 10^6$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. 56

Figura 23b. Conteo Total de Hemocitos ($\text{cel} \times 10^6$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E). 57

Figura 24. Actividad de Lisozima (Act/min/mg) en el grupo control (C) y en la jaula 6 de Hipoxia. 58

Figura 25a. Concentración de nitritos ($\mu\text{M/L}$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. 60

Figura 25b. Concentración de nitritos ($\mu\text{g/L}$) en el grupo control (C) y en el grupo ejercicio (E). 60

Figura 26. Concentración de nitritos en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia (J6). 61

Figura 27. Concentración de nitratos ($\mu\text{M/L}$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. 62

1. Introducción

La producción acuícola ha progresado impresionantemente durante las últimas dos décadas (Hannesson, 2003), con una tasa de crecimiento en los ochentas del 5.3% y en los noventas de 7.1% (FAO, 2002). Demostrando que la acuicultura tiene gran potencial y en especial la de los crustáceos como el camarón, donde las especies comerciales más importantes son *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *P. chinensis*, *P. orientalis*, *L. stylirostris* y *P. japonicus* (FAO, 2002).

Actualmente la producción acuícola del camarón a nivel global se encuentra alrededor de un millón de toneladas cúbicas, lo cual es equivalente a un tercio de toda la producción incluyendo las pesquerías (Neiland *et al.*, 2001). En México dicha actividad se ha visto incrementada enormemente en los últimos 20 años, en especial en el noroeste del país en donde se encuentran el 97% de las granjas de camarón, convirtiéndose en una de las zonas productoras de camarón más importantes en Latinoamérica (Páez-Osuna *et al.*, 2003).

Sin embargo, la acuicultura de camarón está siendo afectada seriamente por problemas asociados con la degradación del ambiente y con enfermedades infecciosas y no infecciosas (Guzmán y Ascencio, 2000). Tal situación se ha vuelto grave con la intensificación del cultivo y por la falta de conocimiento en el manejo, la fisiología e inmunidad de los camarones peneidos (Bacherè, 2000).

Esto ha llevado a que los estudios relacionados con la inmunidad de los crustáceos y en especial de los camarones peneidos se haya vuelto una prioridad reciente de los especialistas debido al incremento dramático de las enfermedades infecciosas en organismos cultivados; afectando tanto la sustentabilidad como la economía de la acuicultura de dichos organismos (Muñoz *et al.*, 2000).

Dentro de los agentes causantes de las enfermedades infecciosas del camarón encontramos principalmente vibrios, bacterias, rickettsias, hongos, protozoarios y metazoarios. Sin embargo, se sabe que los contaminantes (químicos y biológicos), la falta de balances nutricionales, los factores genéticos (Bacherè, 2000), las altas densidades en los cultivos, así como los cambios en la salinidad, la temperatura y los bajos niveles de oxígeno tienen un efecto negativo en la salud de los camarones (Lightner y Redman, 1998; Guzmán y Ascencio, 2000; Kautsky *et al.*, 2000).

Por lo tanto, cuando las enfermedades causadas por virus y bacterias, se combinan con condiciones ambientales no óptimas para el cultivo, se tiene como resultado una alta mortalidad en los cultivos (Flegel, 1996: En Lightner y Redman). El estrés por condiciones no óptimas induce respuestas adversas para el organismo, y a pesar de que éstos pudieran parecer saludables durante o inmediatamente después del período de estrés, una enfermedad o una mortalidad masiva puede ocurrir posteriormente (Páez-Osuna *et al.*, 2003).

Tal situación se debe a que el hospedero y el patógeno pueden co-existir con un efecto poco adverso o nulo para el organismo bajo condiciones óptimas (Páez-Osuna *et al.*, 2003), pero dichos hospederos pueden convertirse en agentes patógenos cuando coinciden en los sistemas de cultivos una alta densidad y condiciones ambientales estresantes, como una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y bajos niveles de oxígeno disuelto en el agua (Lightner y Redman, 1998).

Lo anterior enfatiza la necesidad de realizar estudios profundos para entender las causas que afectan los procesos de enfermedad, así como la relación que existe entre los componentes del sistema inmune y las diferentes variables ambientales, los cuales implican un efecto negativo en la salud de los camarones. Este trabajo tiene como objetivo el conocer los niveles de actividad de algunos componentes de la función inmune, (ProFO, FO, α 2-Macroglobulina, NO sintasa u oxido nítrico sintasa, lizosima y conteo total de hemocitos) bajo diferentes grados de hipoxia (condiciones oxigénicas por abajo del nivel de saturación de oxígeno), simulando lo que puede ocurrir en un sistema de cultivo.

2. Antecedentes

2.1. Sistema inmune del camarón

El sistema inmune incluye un conjunto de mecanismos que permiten el reconocimiento de lo propio y lo extraño con el objetivo de proteger la integridad biológica del individuo. Estos mecanismos involucran el reconocimiento del invasor, así como la presencia de un sistema efector que elimina cualquier elemento que afecte dicha integridad (Bayne, 2003). A consecuencia de esto los invertebrados como los camarones han desarrollado a lo largo de su evolución un sistema de defensa para protección, el cual consiste de un sistema inmune innato (Hoffman y Reichhart, 2002; Roch, 1999; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998). Este sistema inmune es llamado innato porque consiste en una línea de defensa no específica (Fujita *et al.*, 2004; Mallon *et al.*, 2003), que incorpora elementos de diferenciación celular, protección contra estrés oxidativo y numerosas moléculas que permiten el reconocimiento cuyo objetivo es eliminar lo no propio (Vorbach *et al.*, 2003).

El sistema inmune innato de los invertebrados ha sido subdividido en humoral y celular (Smith y Chisholm, 1992; Lavine y Strand, 2002). La defensa humoral incluye la producción de péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, todas las complejas cascadas enzimáticas que regulan la coagulación de la hemolinfa y la melanización, así como la producción de todas aquellas moléculas asociadas al reconocimiento de los agentes extraños. La defensa celular por su parte, se refiere a las respuestas mediadas por los hemocitos (células sanguíneas de los invertebrados) como fagocitosis, nodulación y encapsulación (Lavine y Strand, 2002).

2.1.1 Respuesta celular.

Las células sanguíneas de los invertebrados, conocidos como hemocitos, son los efectores primarios de la defensa del hospedero y están involucrados en numerosos

procesos inmunes (Söderhäll y Cerenius, 1992). Los hemocitos en general llevan a cabo funciones esenciales para la inmunidad, tales como la fagocitosis, la encapsulación y la lisis de células extrañas (Söderhäll y Cerenius, 1992; Johansson *et al.*, 2000; LeMoullac y Haffner, 2000). La fagocitosis se refiere a la ingestión de partículas (biogénicas o abiogénicas) por parte de una célula individual. La nodulación se refiere a la unión de múltiples hemocitos en torno de agregaciones de bacterias, mientras que la encapsulación se refiere a la unión de los hemocitos con estructuras más grandes como parasitoides y nematodos, entre otros (Lavine y Strand, 2001). A diferencia de la fagocitosis, la nodulación y la encapsulación implican la formación de capas sobrepuestas de hemocitos alrededor de la partícula blanco (Lavine y Strand, 2002), no obstante en insectos se ha encontrado que la formación de nódulos y cápsulas es muy similar, lo cual sugiere que ambas estructuras son formadas por el mismo proceso.

Los hemocitos de los camarones se encuentran agrupados en tres grupos: los granulares, semigranulares y hialinos. En algunos casos los hemocitos hialinos, se encuentran asociados a fagocitosis, a la producción de especies reactivas de oxígeno y coagulación como se ha visto en cangrejos, mientras que en otras especies, los hemocitos semigranulares parecen ser células fagocíticas (Smith *et al.*, 2003), que pueden llevar a cabo encapsulación, almacenamiento y liberación del sistema proFO, presentando también una función citotóxica (Johansson *et al.*, 2000). En cambio los hemocitos granulares se encargan de la producción de proteínas antibacteriales y opsoninas (Smith *et al.*, 2003) y también actividades de almacenamiento y liberación del sistema proFO, así como de citotoxicidad (Johansson *et al.*, 2000). Se sabe que la función celular de los hemocitos (tanto hialinos como granulares) puede ser activada por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) y los β -glucanos, comprobando su participación en los mecanismos de defensa (Barraco *et al.*, 1991; Campa-Córdova *et al.*, 2002^a; Duvic y Söderhäll, 1990; Vargas-Albores *et al.*, 1993; Vargas-Albores *et al.*, 1996; Vargas-Albores *et al.*, 1997; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

El número de hemocitos puede variar y disminuir dramáticamente durante una infección, de forma que nuevos hemocitos requieren producirse y liberarse de los tejidos hematopoyéticos (Söderhäll *et al.*, 2003). La hematopoyesis es un proceso que consiste en la diferenciación de células madre para producir linfoides específicas. Este proceso ha sido estudiado ampliamente en los vertebrados sin embargo, en los invertebrados todavía no se conoce completamente (Söderhäll *et al.*, 2003). No obstante se sabe que el número de hemocitos puede variar de acuerdo con la infección, el estrés ambiental, y la actividad endócrina durante el ciclo de muda (Gómez-Jiménez, 2000; Johansson *et al.*, 2000).

2.1.2 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Se sabe que los hemocitos responden a diferentes estímulos, liberando radicales libres (Holmblad y Söderhäll, 1999), los cuales son definidos como moléculas que presentan electrones no apareados en su orbita externa, son generalmente inestables y altamente reactivos (Fang *et al.*, 2002). Dentro de estos radicales libres se encuentran tanto las especies reactivas de oxígeno (EROs), como los óxidos de nitrógeno (Arumugam *et al.*, 2000; Gourdon *et al.*, 2001; Nappi *et al.*, 2000; Toreilles y Guérin, 1999; Weiske y Weisner, 1999). Dentro de las EROs se agrupan los iones radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH), estas especies reactivas son formadas durante el metabolismo oxidativo celular (Fukuhara *et al.*, 2002). Tanto las EROs como las especies reactivas de nitrógeno son utilizadas en la destrucción de material extraño (Holmblad y Söderhäll, 1999; Muñoz *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002^b; Winston *et al.*, 1996).

Las especies reactivas de nitrógeno agrupan un gran número de compuestos sin embargo, el óxido nítrico (NO) es uno de los más importantes, ya que a partir de éste son producidas muchas de las especies reactivas de nitrógeno. El NO fue inicialmente considerado como un componente del sistema inmune innato en vertebrados, ya que actúa como agente activo contra infecciones (Kröncke *et al.*, 2001). Actualmente se sabe que es

una molécula distribuida en casi todo el reino animal y que se utiliza en general en la regulación del tono vascular, en la señalización en el cerebro, en los procesos inflamatorios, así como en la eliminación de patógenos como una respuesta inmune no específica (Van der Vliet *et al.*, 1997; Weiske y Weisner, 1999). El NO es generado por muchos tipos celulares en una gran variedad de tejidos, en los vertebrados se sabe que actúa como un agente relajante, como neurotransmisor y, como una molécula efectora del sistema inmune actuando como agente tóxico contra organismos patógenos (Coleman, 2001). La producción del NO se da lugar en las células que participan en el sistema inmune de vertebrados (Bodgan, 2001; Holáň *et al.*, 2001), así como en células asociadas al mismo en invertebrados (hemocitos), con una amplia presencia en diferentes grupos (Arumugam *et al.*, 2000).

El NO es una molécula biatómica simple, con propiedades fisicoquímicas y biológicas debidas a su pequeño tamaño molecular (30 Da). Esta molécula carece de carga y tiene un solo electrón no apareado. Bajo condiciones atmosféricas el NO es un gas, pero dentro de las células y los tejidos, se encuentra en forma de soluto. Su único electrón no apareado es el responsable de que éste sea reactivo químicamente, lo que permite que pueda difundirse fácilmente en los fluidos corporales y en los tejidos, ya que puede cruzar libremente las membranas celulares debido también a su tamaño y a su lipofilidad (Coleman, 2001; Kröncke *et al.*, 2001). Aunque el NO tiene una estructura biatómica simple, es capaz de reaccionar con otras moléculas para formar productos como: NONOatos, S-nitrosotioles, peroxinitritos, nitritos, nitratos, los cuales son tóxicos para los organismos patógenos (Bogdan, 2001; Coleman, 2001). A partir de estudios en vertebrados se sabe que el NO en estado gaseoso es inhibidor de parásitos eucarióticos (*Leishmania major* y *Tripanosoma musculi*), así como de diversas especies bacterianas. También puede directamente inhibir o inactivar enzimas asociadas al ciclo respiratorio y al ciclo del ácido cítrico (ej. aconitasa). Por otro lado el NO y sus productos derivados tienen la capacidad de deaminar nucleótidos, lo que provoca daño en el DNA y mutaciones. Como el peroxinitrito que puede generar sitios abásicos o ruptura de hebras, que el NO junto con

el H_2O_2 pueden actuar sinérgicamente para matar organismos patógenos causando ruptura del DNA (Chakravortty y Hensel, 2003).

El NO como radical, puede reaccionar con O_2 y autooxidarse, propiedad que le permite presentar una vida media que depende de su concentración. Mientras más alta sea la concentración de NO, la probabilidad de su reacción con el oxígeno se incrementa (Kröncke *et al.*, 2001), produciendo consecuentemente: especies reactivas de nitrógeno con la fórmula genérica de NO_x . Dentro de algunas especies reactivas de nitrógeno podemos encontrar: NO_2 , NO_2^- , NO_3^- , N_2O_3 , N_2O_4 , S-nitrosotioles (*S*-NO), peroxinitrito (ONOO^-) y complejos *nitrosil*-metal (Bogdan, 2001; Tapiero *et al.*, 2002; Van der Vliet *et al.*, 1997). Bajo condiciones gaseosas las especies reactivas de nitrógeno más representativas son dióxido de nitrógeno (NO_2), trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y tetraóxidos de trinitrógeno (N_2O_4), pero en solución acuosa y en sistemas biológicos el N_2O_3 es el producto más representado (Coleman, 2001).

Los radicales libres de nitrógeno son inestables y rápidamente son hidrolizados y excretados como nitritos (NO_2^-), pero esta reacción es muy lenta para tener relevancia *in vivo*. Sin embargo, en los sistemas vivos el NO^- puede reaccionar con proteínas, oxidándose y rápidamente formando nitrato (NO_3^-). El NO^- no es tóxico por sí sólo, pero en combinación con aniones superóxido (O_2^-), generados durante la fagocitosis, se produce el anión peroxinitrito (ONOO^-), un compuesto lábil y altamente tóxico, el cual puede descomponerse en especies reactivas con alto potencial oxidante, capaz de oxidar grupos SH, lípidos, DNA, así como causar nitración de los residuos tirosina de las proteínas (Arumugam *et al.*, 2000; Chakravortty y Hensel, 2003). El ONOO^- , o su ácido conjugado ONOOH , reacciona con una gran variedad de moléculas formando nitritos, por lo que el nitrito (NO_2^-), es el mayor producto del metabolismo del NO^- , y los incrementos en NO_2^- han sido relacionados a la producción de éste en el sistema inmune por células fagocíticas (Roch, 1999; Van der Vliet *et al.*, 1997). En vertebrados niveles elevados de NO_2^- están asociados a enfermedades, y aunque el NO_2^- es el principal producto final del metabolismo

del NO^- , éste no se acumula *in vivo*, sino que es rápidamente oxidado a nitratos (NO_3^-) (Van der Vliet *et al.*, 1997; Akaike y Maeda, 2000).

La biosíntesis del NO involucra una oxidación en dos pasos de L-arginina a L-citrulina con la producción subsiguiente del NO. La oxidación de L-arginina es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa: NOS (EC 1.14.13.39) (Abramson *et al.*, 2001; Luckhart y Lee, 2001; Weiske y Weisner, 1999; Gourdon *et al.*, 2001). Por cada molécula de L-arginina una molécula de NO es producida y el nitrógeno del NO es derivado del grupo guanidino terminal de la cadena lateral de la L-arginina (Coleman, 2001). Esta reacción consume 1.5 mol de NADPH y 2 mol de oxígeno por mol de L-citrulina formada. El mecanismo de reacción involucra la hidroxilación inicial de la L-arginina, dando la formación de la N^{G} -hidroxil-L-arginina, la cual también puede ser sustrato de la NOS (Andrew y Mayer, 1999). Por otro lado, la N^{G} -hidroxil-L-arginina, puede ser oxidada a citrulina + NO por un gran número de hemoproteínas (como las peroxidasas y el citocromo P450), además de la NOS. Finalmente, la reacción es seguida por la oxidación del intermediario, utilizando un solo electrón de la NADPH para formar L-citrulina y NO. Aunque este esquema representa la reacción de la NOS, la enzima también es capaz de catalizar la síntesis de productos adicionales como, O_2^- dependiendo de las condiciones (Andrew y Mayer, 1999).

En los vertebrados existen tres isoformas de la NOS: Las dos primeras son la NOS calcio dependiente (nNOS, NOSI) y la NOS endotelial (eNOS, NOSIII). Ambas son consideradas como constitutivas ya que las dos existen como proteínas expresadas constitutivamente en la célula, y tanto la nNOS como la eNOS son reguladas principalmente por flujos de Ca^{+2} y su subsecuente unión con la calmodulina (Bogdan, 2001). La otra isoforma es la NOS inducible (iNOS, NOSII), la cual para ser producida requiere de un inductor, aunque tiene la capacidad de expresarse constitutivamente bajo ciertas circunstancias (Luckhart y Lee, 2001; Sengupta *et al.*, 2003). La iNOS se distingue de la nNOS y de la eNOS ya que presenta actividad independiente del incremento del Ca^{+2}

y puede sintetizarse en grandes cantidades (Andrew y Mayer, 1999). Aunque las tres isoformas catalizan la misma reacción difieren con respecto a su regulación, la amplitud y duración de la producción de NO, así como con su distribución celular y tisular (Bogdan, 2001). La tres NOS funciona como un dímero el cual puede ser dividido funcional y estructuralmente en: la reductasa del extremo C-terminal, la cual requiere cofactores como NADPH, FMN y FAD (similar a la citocromo reductasa P-450), y la oxigenasa del extremo N-terminal, la que requiere cofactores como Fe, BH₄. Ambos dímeros están en contacto con una calmodulina (CaM) y los tres tipos de NOS se caracterizan por presentar regiones de alta homología (Andrew y Mayer, 1999).

La actividad de la NOS ha sido demostrada en hemocitos de *Viviparus ater* (Roch, 1999), en diversos invertebrados como *Drosophila melanogaster* (Sengupta *et al.*, 2003) y *D. teissieri* (Nappi *et al.*, 2000), *Rhodnius prolixus*, *Anopheles stephensi*, *Bombyx mory*, *Limulus polyphemus*, *Estigmene acarrea* (Weiske y Weisner, 1999) y en el crustáceo marino *Procambarus clarkii* (Zou *et al.*, 2002). En otros invertebrados como *Mytilus edulis* se ha encontrado una isoforma de NOS (cNOS) que es regulada por los niveles de calcio intracelular dentro de los inmunocitos (Nieto-Fernández *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha demostrado que en los hemocitos de los bivalvos marinos, existe la generación y liberación de NO cuando éstos son estimulados por esteroides de forbol (PMA) y LPS. Tal es el caso de *Mytilus galloprovincialis* en el cual se ha reportado la producción del ONOO⁻, asociada a fagocitosis, así como la producción *in vitro* de NO₂⁻ y NO₃⁻, cuando los hemocitos son incubados con PMA, laminarina, células de levadura muertas y zimozan (Arumugam *et al.*, 2000; Toreilles y Guérin, 1999; Gourdon *et al.*, 2001).

2.1.3 Componentes humorales del sistema inmune.

La defensa humoral de los invertebrados es generalmente entendida como un conjunto de factores plasmáticos, los cuales actúan en contra de los microorganismos, células extrañas y material abiótico. Estos factores incluyen naturalmente moléculas

inducibles y bioactivas (las cuales aglutinan, precipitan o inactivan partículas no propias), así como aquellas que tienen propiedades bactericidas, líticas o bacterioestáticas (Smith y Chisholm, 1992).

Aunque los invertebrados no presentan inmunoglobulinas, dentro de la respuesta humoral se encuentran componentes de reconocimiento que son parte del sistema de defensa. Estos componentes de reconocimiento se identifican como proteínas, que se unen y permiten la aglutinación de componentes extraños. En crustáceos esta actividad de reconocimiento ha sido reconocida en *Pacifastacus leniusculus* (Duvic y Söderhäll, 1990, Lee *et al.*, 2000), *Astacus astacus*, *Procambarus clarkii* (Duvic y Söderhäll, 1993), *P. monodon* (Sritunyalucksana *et al.*, 1999; Sritunyalucksana *et al.*, 2002), *Carcinus maenas* (Thörnqvist *et al.*, 1994), *Liocarcinus depurator* (Hammond y Smith, 2002), y *Farfantepenaeus californiensis* (Vargas-Albores *et al.*, 1993, Vargas-Albores *et al.*, 1996, Vargas-Albores *et al.*, 1997, Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000).

Dentro del sistema inmune de reconocimiento de los crustáceos encontramos proteínas tales como, la proteína de unión a los lipopolisacáridos (LPS-BP, lipopolysaccharide binding protein), la proteína de unión a los β -glucanos (BGBP, β -glucan binding protein) y las proteínas de unión a los peptidoglicanos. Estas proteínas activan la defensa celular, después de una reacción con el ligando. La LPS-BP es una proteína capaz de formar complejos con los componentes de la pared celular de bacterias Gram negativas, para estimular la respuesta inmune por parte de los hemocitos. Por su parte La BGBP es una proteína que reconoce 1,3 β -glucanos y estimula a los hemocitos para liberar el sistema proPO (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). Esta ha sido caracterizada en los decápodos como *P. californiensis* (Vargas-Albores, 1996). Este tipo de proteínas son importantes ya que, aunque los invertebrados no presentan inmunoglobulinas, dichas proteínas son capaces de reconocer el material extraño (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Aunque la BGBP no es capaz de liberar y activar el sistema proFO *per se*, el complejo proteína-glucano puede reaccionar con los hemocitos, incrementando el

efecto de los glucanos en el sistema proFO, de esta forma la BGBP sólo es capaz de activar las funciones celulares después de reaccionar con los β -glucanos (Vargas-Albores *et al.*, 1997).

Los péptidos antimicrobianos son otro componente humoral, que se encuentran ampliamente distribuidos en mamíferos, aves, anfibios, insectos, plantas, y varios microorganismos. Aunque estos péptidos presentan una gran diversidad, son comúnmente de características catiónicas y anfifílicas, y la mayoría de ellos matan a las bacterias permeabilizando sus membranas celulares (Papagianni, 2003). En camarón *L. vannamei* ha encontrado la presencia de una familia de péptidos antimicrobianos, conocidos como peneidinas demostrando que dichos péptidos tienen tanto actividad antibacterial para Gram positivas, así como actividad fungicida. Estos péptidos son liberados en la hemolinfa a través de exocitosis por parte de los hemocitos, mediante la activación microbiana (Bacherè *et al.*, 2000; Destoumieux *et al.*, 2000^a; Detostoumieux *et al.*, 2000^b).

Dentro del sistema de defensa humoral también encontramos el sistema de coagulación de la hemolinfa. Que se da como una respuesta de defensa esencial ya que previene la pérdida de hemolinfa debida a heridas en el exoesqueleto y a la diseminación de las bacterias en todo el cuerpo (Montaño-Pérez *et al.*, 1999). Hasta ahora se han descrito en crustáceos dos tipos de mecanismos de coagulación, uno de ellos observado en *Tachypleus tridentatus*, el cual presenta una cascada de coagulación derivada de los hemocitos. Y que es activada por componentes microbianos, donde la proteína soluble de coagulación (coagulógeno) es convertida en un agregado insoluble (coagulina). El otro mecanismo de coagulación se origina por la actividad de una trasglutaminasa (TGasa), la cual ha sido descrita para *P. leniusculus*, en donde la trasglutaminasa, que es Ca^{+2} dependiente comienza a entrecruzar las moléculas de la proteína de coagulación (PC) (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

Otro factor humoral de adhesión celular es la peroxinectina, la cual presenta actividad peroxidasa, y ya ha sido identificada y clonada en *P. monodon* (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). Esta proteína es sintetizada por los hemocitos granulares en una forma inactiva, liberándose como respuesta a un estímulo. La actividad de la peroxinectina esta relacionada con la activación del sistema proFO así mismo, presenta actividad de adhesión celular, facilita la degranulación, promueve la actividad de encapsulación, y presenta actividad de tipo opsónica y de peroxidasa (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

Otros componentes de la respuesta humoral incluyen agentes líticos, como lisozima y péptidos antimicrobianos (Smith y Chisholm, 1992). La lisozima (E.C. 3.2.1.17) ha sido descrita como un componente del sistema inmune innato en los crustáceos, funcionando como una proteína antibacterial. La lisozima es comúnmente incluida en la familia de los péptidos antibacterianos, por su bajo peso molecular y su efecto bacteriolítico. Su actividad se basa en la hidrólisis del enlace glicosídico β -1-4 de los peptidoglicanos, los cuales se encuentran en la pared celular de las bacterias. La lisozima actualmente ha sido identificada y clonada en los camarones *L. vannamei* (Sotelo-Mundo *et al.*, 2003), *P. monodon*, *L. setiferus* y ha sido caracterizada para *Marsupenaeus japonicus* (Hikima *et al.*, 2003).

2.1.4 El sistema de la fenoloxidasa en camarón.

Las fenoloxidasas representan el mayor grupo de enzimas involucrado en actividades metabólicas secundarias, comúnmente asociadas a la producción de melaninas y otros pigmentos. Usualmente la reacción de polimerización que estas enzimas realizan, se relaciona con cambios en las propiedades de las paredes celulares, interacciones celulares, remoción y detoxificación de ciertos metabolitos secundarios, así como con su participación en la inmunidad (Griffith, 1994). El término genérico de fenoloxidasa, fenolasa o polifenol oxidasas sirve para describir aquellas enzimas que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos, vía oxígeno molecular. Dada la complejidad y la diversidad de estas rutas metabólicas en la naturaleza, no es sorprendente la gran cantidad

de substratos usados por estas enzimas, lo que provoca confusión en su terminología (Whitaker, 1994).

La fenoloxidasas o polifenol oxidasas (1,2-benzenediol: oxígeno oxido-reductasa, EC. 1.14.18.1) también es conocida como tirosinasa, polifenolasa, fenolasa, catecoloxidasas, cresolasa o catecolasa. El término tirosinasa es comúnmente aplicado en los mamíferos, ya que tiene una alta especificidad por tirosina y por el sustrato dihidroxifenilalanina ó L-DOPA (Whitaker, 1994). En el caso de los crustáceos esta enzima es conocida solo como fenoloxidasas ó FO (1,2-benzenediol: oxígeno oxidoreductasa; EC. 1.14.18.1). Esta participa activamente en el sistema inmune de los crustáceos y otros invertebrados llevando a cabo el proceso de la melanización (Johansson y Söderhäll, 1989).

El proceso de melanización en el cual la FO se ve involucrada consiste de una compleja cascada enzimática, que involucra la activación del zimógeno de la FO, la pro-fenoloxidasas (proFO) para convertirla en su forma activa, que bajo estas condiciones cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, que pueden polimerizarse de forma no enzimática para formar melanina (Hernández-López *et al.*, 1996). La enzima tiene propiedades antimicrobianas (Jeongmok *et al.*, 2000) y se encuentra localizada principalmente dentro de los hemocitos granulares, aunque recientemente Hernández-López *et al.*, (2003) reportan haber encontrado que la FO se encuentra predominantemente en el plasma de algunos crustáceos (como *Panulirus interruptus*). El sistema proFO puede ser específicamente activado por β -1,3-glucanos, paredes celulares bacterianas, lipopolisacáridos, e *in vitro* por SDS (Nellaiappan y Sugumaran, 1996), urea, etanol y tripsina bovina comercial (Hernández-López *et al.*, 1996).

Para que la proFO pueda ser activada se requiere que la enzima activadora de la proFO ó PPAE (una serin proteasa tipo tripsina) corte el péptido de activación en presencia de Ca^{+2} (Ashida y Söderhäll, 1989, Cárdenas y Dankert, 1997, Gollas-Galván, 1997), ya que este ión es requerido para la conversión de la PPAE en una proteinasa capaz de

transformar a la proFO en FO activa, produciendo un péptido de 7kDa, mediante hidrólisis (Gollas-Galván, 1998). Se sabe que ciertos iones como el Ca^{+2} juegan un papel importante en la activación del sistema de la proFO sin embargo, se ha demostrado en *F. californiensis* que el Ca^{+2} no es directamente requerido para la actividad de la FO (Gollas-Galván *et al.*, 1997). Lo que implica que alguna proteína activadora endógena del sistema de la proFO puede estar participando junto con el calcio para incrementar dicha activación, hasta llegar a un nivel de saturación. Además del calcio se ha reportado que la actividad de FO se puede incrementar por la concentración de Mg^{+2} así como por otros iones, aunque se necesitan más estudios para conocer cuál es el papel de éstos en el sistema proFO (Gollas-Galván *et al.*, 1997; Perazzolo y Barranco, 1997).

La FO y la proFO han sido aisladas en muchos crustáceos e insectos, incluso en algunos casos se tiene la secuencia del cDNA. En general dentro de los crustáceos, la masa molecular de la proFO esta dentro del rango de 76.1 kDa a 114kDa en diferentes especies de peneidos (Gollas-Galván *et al.*, 1999; Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). Algunos autores reportan que existen especies de insectos en donde el peso molecular de la FO puede variar de 250 kDa en *Heliothis virescens* a 73 kDa en *Allogramus auricollis*, tal variación en los pesos moleculares al parecer esta dada por la capacidad de la FO de aglutinarse y formar desde monómeros hasta hexámeros (Gollas-Galván *et al.*, 1999; Jaenicke y Decker, 2002).

Debido a que la proFO es un zimógeno, a partir de estudios de cDNA y purificación de proteína, se ha podido encontrar y deducir que existe una gran similitud entre las diferentes secuencias de la proFO (Joengmok *et al.*, 2000). En la proFO de camarón café (*F. californiensis*) obtenida a partir de hemocitos, se presenta una secuencia de 3003 bp, la cual contiene un marco abierto de lectura de 2121 bp que codifican para un polipéptido putativo de 688 aa con una masa molecular de 78.7 kDa. Esta masa molecular es diferente de la encontrada para *P. monodon* (78.7 kDa), lo cual sugiere que la proFO sufre de modificaciones post-traduccionales (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). Por su parte la

PPAE, ha sido purificada de varios artrópodos como *Manduca sexta*, *Bombyx mori*, *Drosophila sp.* (Chosa *et al.*, 1997). En el caso de la activación de la proFO se ha observado que puede ser activada por algunas proteinasas comerciales como tripsina (Holmblad y Söderhäll, 1999; Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

La FO no sólo participa en los procesos de defensa del organismo, contribuye en forma importante en el proceso de la esclerotización, en donde su función es oxidar difenoles para formar las quinonas correspondientes, éstas reaccionan con las cadenas laterales de las moléculas proteicas, uniéndolas y endureciéndolas, lo que ayuda a la formación de la cutícula. De manera que esta enzima participa activamente en el proceso de ecdisis o muda, en donde los niveles de FO se encuentran elevados en la etapa de premuda temprana y los más bajos en organismos recién mudados o en estado de postmuda (Joengmok *et al.*, 2000). Por su parte Cheng *et al.* (2003)^a y Liu *et al.* (2004) encontraron que los niveles más altos de FO, se encuentran en organismos en intermuda, por lo que se requieren más estudios para determinar cómo y bajo qué condiciones la FO opera durante el proceso de ecdisis.

Es importante tener en cuenta que el sistema de proFO es afectado no sólo por los cambios intrínsecos del individuo (condiciones internas como esclerotización), sino también por cambios en los factores ambientales y biológicos (patógenos). Algunos estudios en crustáceos muestran cómo algunos parámetros ambientales, tales como temperatura (Pascual *et al.*, 2003), pH, condiciones bajas de oxígeno (Le Mullac y Haffner, 2000; Cheng *et al.* 2002^a), así como estrés por aclimatación (Sánchez *et al.*, 2001), pueden alterar los mecanismos reguladores del sistema proFO. Debido a que el medio ambiente se encuentra en constante cambio, el organismo requiere de un sistema inmunitario que se encuentre regulado ante la presencia de cualquier cambio en el ambiente (biológico o netamente ambiental). Como respuesta a esta presión, el sistema de la proFO integra moléculas que son capaces de reconocer al material extraño, señales que permiten la inducción de producción y/o liberación de compuestos que eliminen dicho agente, así como

procesos de regulación y coordinación para su buen funcionamiento (Homblad y Söderhäll, 1999).

2.1.5 Regulación del sistema de la proFenoloxidasa.

Dentro de los moduladores de la función humoral se encuentran ciertas proteínas inhibitorias de la actividad proteolítica, que pueden existir en el plasma o en los gránulos que presentan los hemocitos. Algunos de los inhibidores que se han encontrado en hemolinfa de artrópodos son los de serin-proteasas tipo Kazal, Kunitz, serpina y α 2-macroglobulina. Aunque estos inhibidores son de diferentes familias, presentan diferencias en su secuencia de aminoácidos y en su conformación no obstante, todos tienen la característica de presentar puentes disulfuro múltiples cuya presencia les confiere cierta rigidez, que les ayuda a retener el centro activo, el cual interactúa con el sitio activo de las proteasas, para una correcta inhibición (Kanost, 1999).

En comparación con los otros grupos de inhibidores, las α 2-macroglobulinas, son proteínas mucho más grandes y tienen mecanismos inhibitorios diferentes. Por ejemplo, cada subunidad de la α 2M contiene una región expuesta (un tioester β -cisteinil- γ -glutamil intramolecular), que se encuentra localizada en una región protegida en la α 2M. Dicha región es susceptible a sufrir un corte proteolítico por actividad de proteasas (no sólo serín-proteasas), lo cual favorece un cambio conformacional en la α 2M, de forma que ésta atrapa la proteasa en una cavidad formada por su estructura dimérica. En el caso de los invertebrados, este cambio de conformación permite la formación de un enlace covalente entre la región tiol-éster de la α 2M y la cadena lateral de la lisina de la proteasa, lo que da como resultado una inhibición irreversible (Ramos *et al.*, 1997; Yigzaw *et al.*, 2001).

En general, la función de las proteasas de muchos patógenos es ayudar a penetrar la cutícula del artrópodo hospedero. Algunos de los inhibidores de proteasas presentes en el organismo sirven para defender al hospedero de la acción hidrolítica de dichas enzimas. Pero también los inhibidores como la α 2M tienen un papel importante en la regulación de

ciertas proteasas intrínsecas del hospedero, en donde la función de estas proteasas es favorecer el proceso de coagulación (Amstrong *et al.*, 1996) y la activación de ciertos zimógenos, como el zimógeno de la FO. Se sabe que la $\alpha 2M$, tiene un papel regulador en la activación de la proFO, mediante la inhibición de la PPAE, este proceso inhibitorio es muy importante para la modulación de la respuesta inmune innata en los invertebrados (Kanost, 1999). La actividad de la $\alpha 2M$ y su purificación ya ha sido descrita para *L. vannamei*, se cree que su actividad esta relacionada con la regulación del sistema proPO en camarón (Gollas-Gálvan *et al.*, 2003).

2.2 Efecto de las condiciones ambientales en el sistema inmune.

Bajo condiciones naturales en el océano, las variables ambientales son generalmente estables (ej. la salinidad, pH, y oxígeno) sin embargo, en condiciones de cultivo existe un incremento natural de oxígeno durante el día dado principalmente por la fotosíntesis (del fitoplancton y las macrófitas), mientras que en la noche existe un incremento en la respiración, lo que disminuye la concentración de oxígeno disuelto y provoca la generación de ambientes hipóxicos tanto en la columna de agua como en el fondo del estanque (Cheng *et al.*, 2002^a; Cheng *et al.*, 2003^b). La hipoxia se define cuando se tienen niveles de oxígeno disueltos menores a 2.8 mg O₂/mL (equivalente a 2 mL O₂/l ó 91.4 mM) (Wu, 2002). Tales ambientes causan estrés en los organismos, definiendo estrés como cualquier evento que provoque un riesgo en la integridad fisiológica de un organismo (Greenberg *et al.*, 2002), en donde para que ocurra se requiere de un estímulo (estresor), que pone en alerta al organismo (percepción del estrés), el cual activa los sistemas metabólicos para iniciar la respuesta a dicho estrés (Dhabhar, 2002).

Bajo condiciones aeróbicas, los organismos pueden utilizar los lípidos, proteínas, y carbohidratos como combustibles para la obtención de energía. No obstante, bajo condiciones bajas de oxígeno, los carbohidratos se convierten en el primer sustrato y son utilizados a través del metabolismo anaeróbico para producir ATP (Larade y Storey, 2002), bajo dichas condiciones hipóxicas la fosforilación oxidativa se ve modificada, afectando la

respiración mitocondrial y el poder REDOX del transporte de electrones, lo que finalmente afecta el metabolismo aeróbico (Gnaiger, 2001). Es durante estas bajas condiciones de oxígeno se induce un paro metabólico aeróbico, es decir que el ATP producido a través de la fosforilación oxidativa se ve reducido por la falta de oxígeno molecular. Durante el proceso de la fosforilación oxidativa en condiciones ricas en oxígeno la F_1F_0 -ATPasa (mitocondrial) es la principal enzima que produce ATP en las células animales sin embargo, esta enzima tiene actividad reversible, bajo condiciones de hipoxia y anoxia esta enzima consume ATP en vez de generarlo, debido una modificación en el flujo de protones (H^+). Bajo condiciones bajas de oxígeno, la difusión de éste a la mitocondria se reduce, por lo que las células están limitadas al ATP disponible por la glucólisis. A causa de esto todos los procesos que consumen ATP son reducidos para mantener el balance entre el suplemento de energía y la demanda de ésta. En algunos organismos marinos se sabe que los genes de la síntesis de proteínas se regulan hacia abajo, y que aquellos que participan en la producción del ATP vía glicólisis y gluconeogénesis son regulados hacia arriba, suprimiendo el crecimiento celular y canalizando la energía a procesos metabólicos esenciales (Wu, 2002; Boutilier y Pierre, 2000).

Por tal razón, la generación de ATP derivada de la fosforilación oxidativa se ve disminuida, en tanto que la demanda celular de ATP permanece constante, lo que genera un déficit energético. Bajo estas condiciones las células recurren a la ruta metabólica anaeróbica para la generación de ATP (efecto Pasteur) sin embargo, debido a que este proceso propicia la acumulación de productos fermentables y otros de naturaleza tóxica la producción del metabolismo anaerobio del ATP sólo se mantiene temporalmente (Boutilier y Pierre, 2000). En los camarones al igual que otros organismos, se ha demostrado que bajo condiciones de hipoxia la concentración de lactato se ve incrementada como un reflejo de la ruta anaerobia de producción de ATP (Hervant *et al.*, 1999). El lactato es producto de la deshidrogenación del piruvato (generado durante la glucólisis), en general este se acumula en músculo, como una forma químicamente estable dentro del organismo (Zou *et al.*, 1996).

Por lo general, la hipoxia impide un desarrollo fisiológico normal en los crustáceos, ya que reduce la frecuencia de muda, retarda el crecimiento y causa mortalidad (Cheng *et al.*, 2003^b). Los organismos responden a la hipoxia de formas diferentes ya respuestas de tipo fisiológico ó también conductual sin embargo, se ha demostrado que ambas dependen del estado fisiológico de los organismos, así como de otras variables ambientales, tales como pH, salinidad y temperatura (Rosas *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002). Se piensa que la respuesta de los organismos ante bajas condiciones de oxígeno está asociada a la presencia de un sensor de oxígeno. En *Artemia franciscana* se ha identificado un sensor molecular de niveles ambientales de oxígeno dentro de la mitocondria, donde la señal generada regula la demanda de energía y las rutas metabólicas implicadas en la necesidad de energía (síntesis y degradación proteica, síntesis de glucosa, síntesis de urea y mantenimiento de los gradientes electroquímicos), lo que permite un balance energético en las células bajo niveles de ATP muy bajos (Wu, 2002).

Aunque en algunos mamíferos se conocen ampliamente los efectos que tiene la hipoxia en el metabolismo, incluso a nivel molecular, en los organismos marinos esta respuesta es poco conocida. Por ejemplo, se sabe que algunos organismos marinos sobreviven la 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). Otras de las estrategias que presentan los organismos acuáticos al encontrarse en ambientes hipóxicos es hacer más eficiente la capacidad de difusión branquial, mediante en el flujo de agua a través de las branquias, y/o un aumento en el número de lamelas branquiales (Wu, 2002). Así como modificar el balance ácido-base de la hemolinfa para incrementar la capacidad de unión de la hemocianina, la osmolalidad de la hemolinfa y la concentración de iones (Cheng *et al.*, 2003^b; McMahan, 2001^a). Larade y Storey (2002) mencionan que los invertebrados marinos responden a la hipoxia con un incremento en la cantidad de combustibles fermentables en los tejidos, para lo que recurren a la producción de compuestos alternativos y ácido láctico. También estos autores mencionan que debido a la hipoxia, los organismos pueden presentar una disminución en la

tasa metabólica, con una reducción en la utilización de ATP por los tejidos, junto con un incremento en el catabolismo de los carbohidratos que lleva a compensar el incremento en la demanda de ATP.

Se ha demostrado en los trabajos de LeMoullac *et al.* (1998) y en los trabajos de Cheng *et al.* (2002)^a, que bajo condiciones de déficit energético, provocado por hipoxia, la respuesta inmune de los crustáceos se ve modificada en un período de 24 a 120 h. Es importante mencionar que estos estudios se han centrado en el análisis del efecto de la hipoxia en niveles crónicos (24-120 h de exposición) (Dhabhar, 2002). Sin embargo, falta información que revele los efectos que provocan las condiciones de hipoxia aguda en el sistema inmune, ya que la disminución de oxígeno en el ambiente, es un proceso relativamente rápido.

Se cree que las enfermedades causadas por el virus de la mancha blanca son iniciadas o disparadas por cambios en la calidad del agua, incluyendo entre otras cosas, dureza, temperatura, pH, oxígeno disuelto, altas concentraciones de amonio (Kautsky *et al.* 2000, Cheng y Chen, 2000^b, Cheng y Chen, 2002), y salinidad (LeMoullac y Haffner, 2000). Por otro lado, se sabe que niveles bajos de oxígeno y condiciones altas en amonio en estanques, junto con altas densidades, incrementan la sensibilidad de los camarones peneidos a la vibriosis (Liu y Chen, 2004; Le Moullac *et al.*, 1998).

Al parecer existe una relación entre las condiciones ambientales y las enfermedades, no obstante, por su complejidad se requiere de más información para establecer su naturaleza. Se sabe que las alteraciones existentes en la calidad de agua (ej. presencia de calcio y magnesio) pueden indirectamente incrementar el estrés de los organismos, y disminuir su respuesta inmune (Abbot, 1994; Kautsky *et al.*, 2000; Páez-Osuna *et al.* 2003; Guzmán y Ascencio, 2000). Así mismo las fluctuaciones en las condiciones ambientales (ej. temperatura, salinidad y oxígeno) tienen un efecto significativo en el estado inmune de los organismos (LeMoullac y Haffner, 2000; Sánchez *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003), como la cantidad de hemocitos presentes, la activación de la proFO, los índices de fagocitosis y liberación de radicales libres de oxígeno (LeMoullac y Haffner, 2000).

En crustáceos como *Macrobrachium rosenbergii* existen factores que reducen la resistencia inmune a bajos niveles de oxígeno disuelto y estrés causado por presencia de amonio en el ambiente (Cheng y Chen, 2002; Cheng *et al.*, 2002^a). También para esta especie se ha demostrado que la temperatura, el pH y la salinidad tienen un efecto en los conteos totales de hemocitos (CTH), así como en la actividad de la fenoloxidasa (Cheng y Chen, 2000^b). En otros organismos como *F. paulensis*, se ha demostrado que los cambios de salinidad y el manejo de los organismos provocan estrés fisiológico reduciendo de forma significativa la actividad de la FO y los conteos totales de los hemocitos (Perazzolo *et al.*, 2002). En *L. setiferus* se encontró que cambios en la temperatura del agua modifican la cantidad de hemocitos y afectan al sistema de la FO (Pascual *et al.*, 2003). Así también se ha demostrado en el abulón *Haliotis diversicolor* que existe un efecto negativo en el sistema inmune, en especial cuando los niveles de oxígeno son bajos, con un aumento en la susceptibilidad a *Vibrio parahaemolyticus*, cuando los niveles de oxígeno son bajos (Cheng *et al.*, 2004), también en *Haliotis tuberculata* se ha demostrado el efecto negativo que tiene el estrés por salinidad y manejo en la inmunidad de este organismo (Malham *et al.*, 2003).

3. Justificación

La industria camaronera tiene una gran importancia económica en nuestro país. Sin embargo, enfrenta graves problemas debido a la aparición de enfermedades en los camarones cultivados. Aunque el camarón cuenta con un sistema de defensa que elimina eficientemente a los patógenos, este sistema puede ser afectado por distintas variables biológicas, químicas y ambientales.

Uno de los problemas más comunes en el cultivo de camarón es la disminución de oxígeno (hipoxia) que produce en los sistemas de cultivo, provocando estrés en los camarones. Este estrés puede generar mayor susceptibilidad de los organismos a sufrir ataques de patógenos. No obstante, no se conoce cómo la hipoxia puede modificar la actividad de los componentes asociados al sistema inmune de camarón, ya que los estudios realizados hasta ahora sobre el efecto que tiene la hipoxia en la respuesta inmune de los crustáceos difiere a lo que ocurre realmente en un sistema de cultivo (disminución gradual en la concentración de oxígeno disuelto en pocas horas).

Por estas razones es importante estudiar cómo bajo condiciones de hipoxia aguda semejantes a lo que ocurre en un sistema de cultivo, se modulan algunos de los componentes principales del sistema inmune. Con este trabajo se busca contribuir al conocimiento de la modulación del sistema inmune en condiciones hipóxicas para poder desarrollar metodologías de cultivo que permitan mantener a los organismos en buen estado de salud.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Conocer los niveles de actividad de componentes del sistema o función inmune (ProFO, FO, α 2-macroglobulina, conteos totales de hemocitos, NO sintasa y lisozima) bajo condiciones de saturación de oxígeno, y su variación bajo diferentes grados de hipoxia (condiciones oxigénicas por abajo del nivel de saturación de oxígeno).

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar si los diferentes grados de hipoxia afectan algunas variables del metabolismo (niveles de lactato, glucosa, proteína y colesterol) del camarón blanco.
2. Determinar la influencia de la hipoxia en algunos de los componentes del sistema inmune humoral (FO, proFO, α 2M, lisozima) y celular (número total de hemocitos) en el camarón blanco.
3. Evaluar la influencia de la hipoxia en la producción de especies reactivas de nitrógeno (nitros y nitritos) como reflejo de la actividad de la NOS.

5. Hipótesis

5.1 Hipótesis General

Los componentes del sistema inmune humoral y celular, así como los del metabolismo energético se alteran en condiciones hipóxicas dependiendo del nivel de oxígeno en el medio, así como de la duración del período de exposición.

5.2 Hipótesis específicas

Los niveles de lactato y glucosa se ven modificados bajo condiciones de hipoxia en el camarón blanco, indicando un paro metabólico aeróbico.

Los componentes del sistema inmune humoral (FO, proFO, alfa2-macroglobulina y lizosima) del camarón blanco se ven afectados bajo condiciones de hipoxia.

Los niveles de los nitritos y nitratos en hemolinfa como expresión de la oxido nítrico sintetasa del camarón blanco se ven afectados bajo condiciones de hipoxia.

El sistema inmune celular (conteo total de hemocitos) del camarón blanco se ven afectados bajo condiciones de hipoxia.

6. Materiales y Métodos.

6.1 Experimento

Obtención de organismos y aclimatación

Se seleccionaron 200 organismos por tamaño (8.0 ± 2 g) y por estadio de muda (Intermuda). Estos fueron capturados de un estanque de cultivo de camarón del CIBNOR. Una vez capturados y seleccionados, estos fueron trasladados en cubetas de 40 L con agua rica en oxígeno (<6 mg O₂/mL) al laboratorio de Bioensayos del CIBNOR.

Una vez en el laboratorio, se colocaron en tinas de 800 L bajo las mismas condiciones fisicoquímicas (tanto de oxígeno disuelto, como de temperatura y pH) del estanque de cultivo del cual fueron capturados. Los organismos fueron monitoreados durante un período de 24 h, para verificar su estado en general. Todos aquellos que murieron durante el traslado fueron reemplazados al día siguiente, hasta completar 200 organismos.

Las tinas de aclimatación fueron previamente forradas de plástico negro y recubiertas por una malla negra para evitar el estrés de los organismos. Las condiciones ambientales establecidas fueron 12h luz: 12 h oscuridad, 28° C, pH 8 y salinidad 35 ± 3 ‰. Durante la aclimatación, se realizó un recambio diario del 50% con agua marina filtrada dos veces con un filtro de 4µm y UV. Los organismos se alimentaron dos veces al día (*ad libitum*), con alimento comercial para camarón P.I.A.S.A (40% de proteína, 7% de grasa, 3% de fibra, 12 % de humedad máxima y 10% de ceniza. Basado en Harinas de pescado, soya, trigo y aceite de pescado, enriquecido con vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, inositol, hierro, cobre, zinc, Mg, Se, Ca). Los organismos fueron mantenidos bajo estas condiciones durante un período de 15 días para su aclimatación.

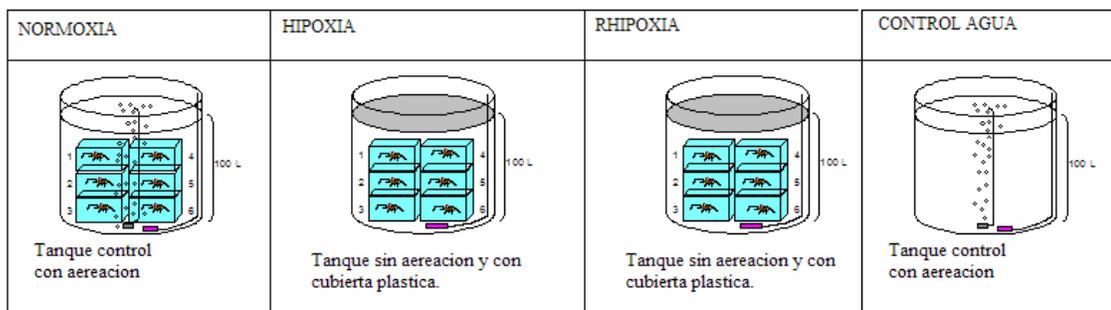
Diseño Experimental

Se seleccionaron 100 camarones y se colocaron en una tina circular de 800 L, bajo las condiciones de aclimatación antes mencionadas, durante 24 h. 12 h antes del experimento los organismos se dejaron de alimentar. Una vez finalizadas las 24 h se muestrearon 10 organismos control (grupo C), para compararlos con los tratamientos de ejercicio, normoxia e hipoxia.

Una vez muestreado el grupo control (grupo C). Los organismos fueron puestos bajo un tratamiento de ejercicio en una tina circular durante 2 h. Esto se logró generando un flujo de agua formando un circuito, y haciendo que los organismos realizaran un nado a contracorriente (Fig.1 Anexo). Esto permitió asegurar la generación de acidolactosis (incremento en el ácido láctico, como un indicador del metabolismo anaerobio) durante el experimento en condiciones de hipoxia como se ha indicado en los trabajos de Moran (2003) y Calderón (2004). Una vez terminado el período de ejercicio se tomó una muestra de 10 organismos para evaluar el efecto por ejercicio (grupo E).

Al final del ejercicio, seis organismos fueron colocados en jaulas plásticas de 50cm x 30cm (Fig. 2, Anexo), y se colocaron un total de seis jaulas por tanque (J1, J2, J3, J4, J5 y J6). De esta manera se tuvieron 36 organismos en los tanques de normoxia (N), de hipoxia (H) y réplica del tanque de hipoxia (RH). En los tanques N y H se agregaron cuatro organismos como testigos en el fondo del tanque sin enjaular, con el fin de determinar el efecto provocado por las jaulas, teniendo un total de 40 organismos en cada tanque.

Las condiciones de temperatura y pH se estabilizaron antes de colocar las canastas dentro de cada uno de los tanques. Para evitar la estratificación del pH se utilizó una bomba de recirculación. El tanque N (tratamiento de normoxia) y el tanque control del agua (CA) se mantuvo con aireación constante, a diferencia de los tanques R y H, en donde no se les aplicó aireación (Fig. 3, Anexo).



El tanque CA se mantuvo en condiciones de normoxia (nivel de saturación de oxígeno, salinidad y temperatura igual que el resto de los tanques) con el objetivo de conocer la fluctuación de las variables fisicoquímicas del agua. La hipoxia (tanques H y RH) fue inducida mediante la respiración de los organismos y la falta de aireación dentro de los tanques, como lo indica Morán (2003). Para mantener estas condiciones de déficit de oxígeno, los tanques fueron cubiertos con una película plástica para evitar intercambio gaseoso entre el agua del tanque y el oxígeno de la atmósfera (Fig. 3, Anexo). En esta forma se obtuvo una curva descendente de la concentración de oxígeno, producto de la respiración de los organismos dentro del tanque. El tanque de RH únicamente sirvió para determinar los niveles del ácido láctico y la glucosa, así como la supervivencia de los organismos después del tratamiento. En el resto de los tanques (Normoxia e Hipoxia) se midieron todas las variables inmunes reportadas en este trabajo.

Cuando los niveles de oxígeno en el tanque sin aireación llegaron a los valores de 4, 3, 2, 1, 0.5 y <0.5 mg O₂/L en los tanques de hipoxia, se sacó una jaula de cada tanque: N, H y RH, repitiendo el proceso para cada nivel de concentración de oxígeno, y muestreando todos los camarones de cada canasta. Los datos de los parámetros ambientales como temperatura, pH y oxígeno disuelto fueron monitoreados y registrados cada 30 minutos en todos los tanques (N, H, RH y CA), tomando una muestra de agua marina cada vez que se sacaba una canasta de los tanques H y RH. Las mediciones de oxígeno y temperatura se realizaron con un oxímetro de campo, y el pH con un potenciómetro, ambos previamente calibrados.

6.2 Análisis de Muestras Biológicas

6.2.1 Toma de Muestras

Extracción de Hemolinfa

A cada camarón se le tomó una muestra de hemolinfa con un volumen mínimo de 300 μL , la cual se extrajo de la región ventral del camarón entre el último par de pereopodos y el primer par de pleópodos. Para evitar la coagulación de la muestra se utilizó SIC-EDTA (450mM de NaCl, 10 mM de KCl, HEPES 10mM, 10 mM EDTA en agua inyectable comercial, pH 7.3), en una relación 1:3 de acuerdo a la técnica descrita por Vargas-Albores (1993).

6.2.2 Análisis de Muestras

Determinación de metabolitos en Plasma de Camarón.

Para la determinación de glucosa en plasma de camarón se usó el método descrito en el kit comercial GOD-PAP (monotest) de Lakeside. El lactato se evaluó usando el método de lactato oxidasa de acuerdo al kit comercial LACTATE-PAP de Randox, para la determinación de colesterol en plasma de camarón se evaluó por el método de CHOD-PAP (monotest) de Lakeside. Para calcular la concentración de lactato (Lac), glucosa (Glu) y colesterol (Col), se usó una curva con el estándar correspondiente.

Cuantificación de Proteína.

La cuantificación de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando una curva de BSA (Bovine SERUM Albumin, SIGMA) lo que permitió obtener la concentración de proteínas totales (mg/mL).

Actividad de Fenoloxidasa (FO).

La actividad de FO fue medida espectrofotométricamente de acuerdo con la formación de dopacromo a partir del sustrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), de acuerdo con Lenonard *et al.* (1985) y modificada para microplaca por Hernández-López, *et al.*, (1996). Para calcular la actividad de la fenoloxidasa se utilizó una curva de tirosinasa

comercial de champiñón (SIGMA), fue a partir de esta curva que se calcularon las unidades de actividad de FO (abs/mg enzima/10 min).

Actividad de Fenoloxidasa Total (FO Tot).

La actividad de la fenoloxidasa total (FO Tot) se determinó de acuerdo con la técnica adaptada a microplaca de Hernández-López, (2001). Para calcular la actividad de la fenoloxidasa se utilizó una curva de tirosinasa comercial de champiñón (SIGMA).

Actividad de la proFenoloxidasa (proFO).

Para conocer la cantidad de FO presente en la muestra como enzima inactiva (proFO), se restó el valor de la actividad de la fenoloxidasa (FO) a la actividad total de la fenoloxidasa (FO Tot), teniendo que $\text{proFO} = \text{FO Tot} - \text{FO}$.

Cuantificación de la Actividad de la α 2-Macroglobulina.

Para cuantificar la actividad de la α 2-Macroglobulina se utilizó la técnica descrita por Gollas-Galván (2003). Para lo cual se colocaron 10 μ L de tripsina porcina comercial (SIGMA) (1mg/mL) en una microplaca y se agregaron 10 μ L de muestra, incubando por 10 min. Luego se adicionaron 10 μ L de SBTI (inhibidor de tripsina), con un tiempo de incubación de 10 min. Posteriormente se agregaron 250 μ L de BAPNA (N α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilide), (1mg/mL disuelto en 100 μ L de DMSO y preparado en agua inyectable). La muestra se incubó por con el BAPNA 10 min y se leyó la absorbancia con un filtro de 415 nm en un lector de microplaca. Como control negativo se agregaron todos los reactivos excepto la muestra, y se les agregó agua en su lugar. En el caso del control positivo se utilizó únicamente tripsina comercial sin inhibidor. Finalmente se calculó la cantidad de tripsina atrapada por la proteinasa (α 2M) con ayuda de una curva patrón de diferentes concentraciones de tripsina comercial.

Determinación de Nitratos y Nitritos en Hemolinfa.

La determinación de nitratos y nitritos se realizó de acuerdo a la micro-técnica adaptada por Hernández-López y Vargas-Albores (*en prensa*), utilizando el reactivo de Griess (SIGMA).

Actividad de Lizosima.

Se tomaron 600 μL de hemolinfa (Dilución 1:3 Hemolinfa:Anticoagulante) y la muestra fue centrifugada a 3600 g por 10 min, y se recuperó el paquete celular, desechando el plasma. A dicho paquete se le agregaron 500 μL de agua inyectable para lizar los hemocitos, y luego la solución fue sonicada para incrementar la lisis, este lisado de hemocitos se utilizó para determinar la actividad de lisozima. Para determinar la actividad de lisozima se utilizó la técnica espectofotométrica de Shugar, (1952), para lo cual se agregaron 490 μL de sustrato (solución de *Micrococcus luteus* 0.2 mg/mL en buffer de Fosfatos $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0.05M, pH 6.8) en 20 μL de muestra en 490 μL de sustrato, con un tiempo de incubación de 10 min, finalmente la muestra se leyó a 450 nm en un lector de microplaca al inicio y al final de la reacción, utilizando lisozima de huevo comercial (1mg/mL) como control positivo. La actividad se calculó como el cambio de absorbancia por minuto por la cantidad de proteína en el lisado de hemocitos, al cual fue calculada por el método de Bradford (1976) antes descrito.

Conteo de Hemocitos.

Para la el conteo total de hemocitos se utilizó la técnica utilizada por Hernández-López (2001). Se tomaron 10 μL de muestra (Solución Hemolinfa:SIC EDTA) a la que se le agregaron 90 μL de formaldehído al 20% en solución SIC-EDTA. Los hemocitos fueron contados en una cámara Newbauer, con la ayuda de un microscopio compuesto.

6.3. Análisis de las Muestras de Agua.

Determinación de Amonio en Agua

Para medir las concentraciones de amonio, se utilizó la técnica de Solórzano (1968) modificada por Calderón (2004).

Determinación de Urea en Agua

Las concentraciones de amonio se midieron utilizando la técnica de Koroleff (1983), la cual se basa en la técnica de McCarthy (1970, en Koroleff, 1983) y que fue modificada para microplaca por Calderón (2004).

Determinación de Nitratos y Nitritos en Agua.

La determinación de nitratos y nitritos se realizó de acuerdo a la micro-técnica adaptada por Hernández-López y Vargas-Albores (*en prensa*), utilizando el reactivo de Griess (SIGMA).

6.4 Análisis Estadísticos.

Todos los datos obtenidos para de los diferentes parámetros obtenidos en este estudio fueron sometidos a un análisis exploratorio (pruebas de normalidad, y homocedasticidad) para determinar el procedimiento estadístico a usar. Cuando los datos cumplieron el principio de normalidad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Todos los análisis estadísticos se realizaron al 95% de probabilidad ($p=0.05$) en el programa Statistica 6.0. En los casos donde hubo diferencias significativas ($p<0.05$), la prueba a posteriori que se utilizó fue la de Tukey ($p=0.05$). En algunos casos para comparar los datos dentro de los tratamientos y entre éstos se realizaron pruebas *t* de Student ($p<0.05$). Todos los datos fueron graficados como media \pm error estándar.

7. Resultados.

7.1 Comportamiento de los organismos durante el experimento.

Durante la aclimatación los organismos mostraron una alta sobrevivencia (98% aproximadamente), probablemente debido a las condiciones de oscuridad y la presencia de refugios que se adaptaron con mallas para evitar el canibalismo, el cual se observó en especial durante el proceso de muda. Así mismo, es probable que la dieta seleccionada haya sido una pieza clave para su mantenimiento, ya que en experimentos preliminares con una dieta comercial con 35% de proteína (P.I.A.S.A) se obtuvo una menor sobrevivencia que la obtenida al utilizar 40% de proteína.

Durante el período de ejercicio se observó en los experimentos preliminares, que algunos camarones tendían a movilizarse hacia el centro de la tina, donde la corriente era menor para evitar esto, se colocó un cilindro en el centro de la tina durante el proceso de ejercicio como lo reporta Moran, (2003) de esta manera la mayoría de los organismos estuvieron sujetos a este. Se sabe que cuando los organismos son sangrados para obtener la hemolinfa, estos pueden moverse bruscamente, incrementando los niveles de ácido láctico por estrés de manejo. El estrés por sangrado se trató de reducir con sujetando a los organismos para evitar la flexión muscular durante este proceso.

Las jaulas que fueron muestreadas con los niveles de oxígeno menores a 1 mg/mL, presentaron camarones con poco movimiento, y algunos con el músculo de color blanco, lo que reflejó la cantidad de ácido láctico. Cabe mencionar que en el tanque RH, los animales fueron sangrados pero no fueron sacrificados, los cuales al ser trasladados a un tanque con condiciones ricas en oxígeno, mostraron una sobrevivencia post-tratamiento del 97.1 % demostrando la capacidad de recuperación de los organismos posterior al evento de hipoxia.

7.2 Variables fisicoquímicas y Consumo de Oxígeno.

El oxígeno dentro de los tanques H y RH (Fig. 1) presentó un descenso constante en la concentración de este parámetro, a causa de la respiración de los organismos. En ambos tanques se observó una disminución acelerada en el nivel de oxígeno en las primeras 3 horas del experimento ($1.33 \text{ mgO}_2/\text{h}$) sin embargo, después de las 4 horas de exposición la concentración de oxígeno disminuyó lentamente ($0.2685 \text{ mgO}_2/\text{h}$), hasta alcanzar un nivel estable en la parte final del experimento ($0.06 \text{ mgO}_2/\text{h}$).

En el caso de los tanques N y CA el oxígeno se mantuvo entre 5 y 6 mg/L (Fig.1), sin embargo, en el tanque N el nivel fue más bajo ($5.26 \pm 0.144 \text{ mgO}_2/\text{L}$) que el anterior ($5.64 \pm 0.838 \text{ mgO}_2/\text{L}$) a causa de la respiración de los organismos.

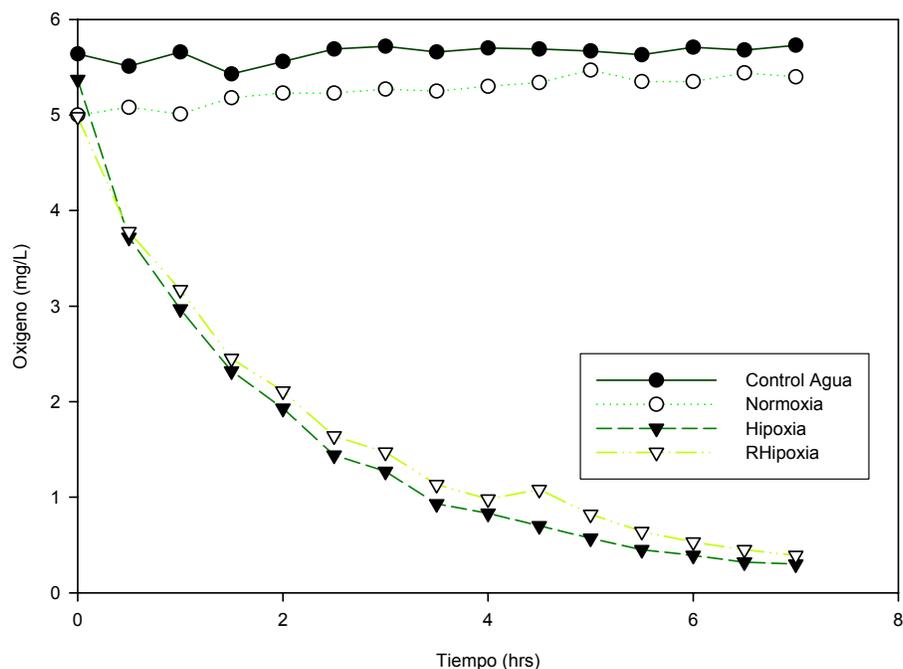


Fig. 1. Niveles de oxígeno disuelto dentro de los tanques de exposición (N, CA, H, RH) durante los experimentos.

El consumo de oxígeno de los animales en el tratamiento de hipoxia (Fig.2) se modificó al descender el nivel de oxígeno como tendencia general. Observando que el

mayor consumo se presentó cuando el nivel de oxígeno fue mayor a 3 mg/L (0.863-0.946 mg/g/h). Una vez que el nivel de oxígeno se encontró en el rango de 3 a 1mg/L, el consumo de este empezó a disminuir (0.186-0.379 mg/g/h) no obstante, cuando el nivel de oxígeno se encontró en niveles por debajo de 0.5 mg/L, se registró el consumo de oxígeno mas bajo (0.058 mg/g/h). En el caso del tanque de H, a diferencia del RH, el consumo disminuyó drásticamente debido a la presencia de los cuatro organismos libres en el fondo del tanque, lo que produjo que el nivel de oxígeno en todos los casos fuera más bajo que en el tanque RH como se observa en la figura 2.

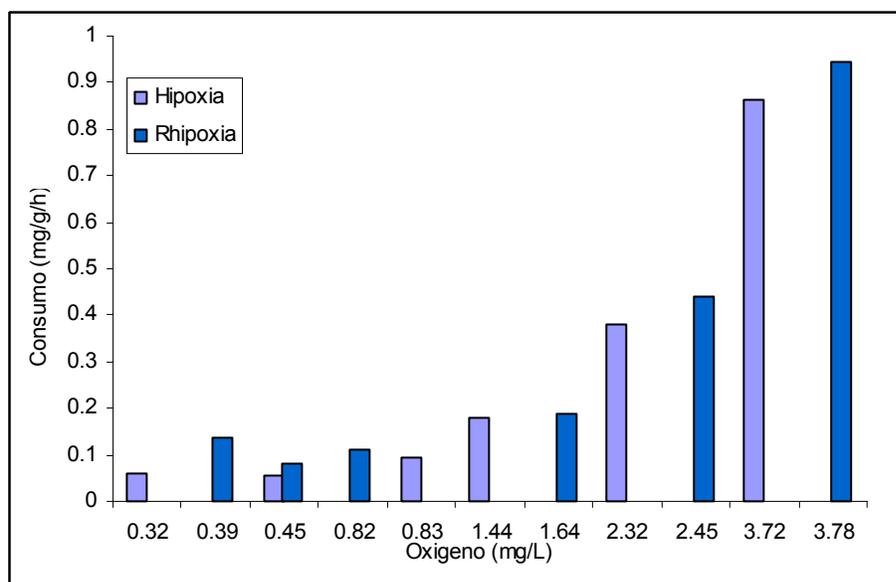


Fig.2. Consumo de oxígeno en los tanques de hipoxia (H y RH).

En el caso del pH (7.87 ± 0.175), salinidad ($35 \pm \text{‰}$) y temperatura (29.92 ± 0.845 °C), no se observó ninguna modificación importante durante el experimento en ninguno de los tanques, permitiendo corroborar que la única variable modificada fue el nivel de oxígeno. En el caso de la temperatura, se observó que se mantuvo en los tanques N, H y RH, alrededor de 30.4 ± 0.28 °C no obstante, en el tanque CA se registró con valores relativamente más bajos (28.56 ± 0.184 °C) que en el resto de los tanques.

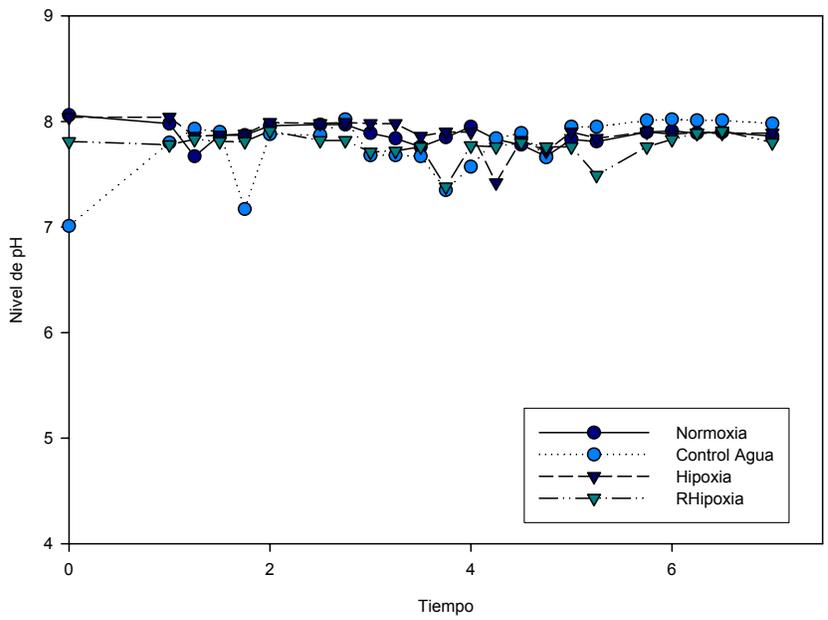


Fig. 3. Nivel de pH en los diferentes tanques (N, CA, H, RH) durante el experimento.

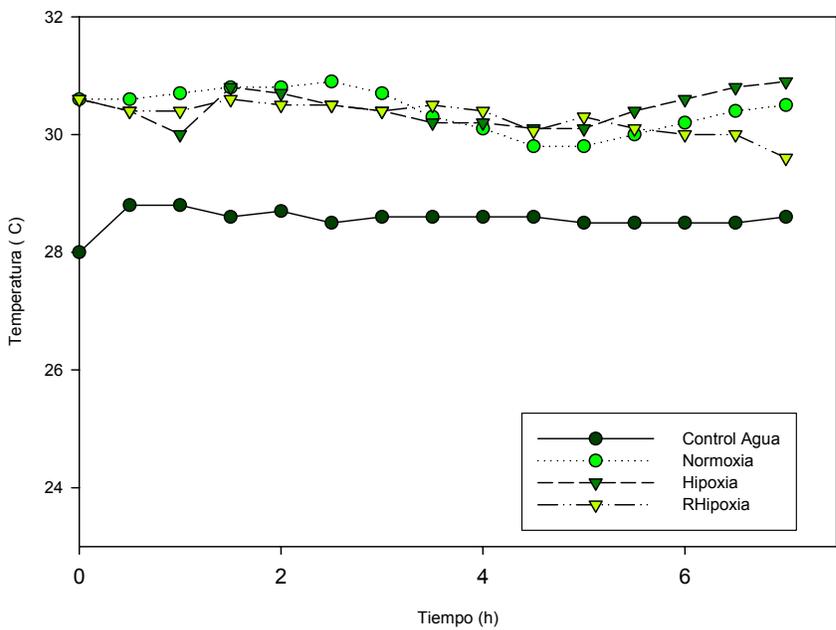


Fig.4. Temperatura del agua en los diferentes tanques (N, CA, H, RH) durante el experimento.

La concentración de urea en del agua cuando se obtuvo el grupo control, fue menor (52.44 $\mu\text{g/L}$) que cuando los camarones fueron sometidos a ejercicio (62.14 $\mu\text{g/L}$). Cabe mencionar que la densidad de organismos presente en la tina de ejercicio, fue diferente a la densidad mantenida en los tanques de normoxia e hipoxia, por lo que los niveles de urea fueron mayores que los obtenidos en estos últimos tratamientos (Tabla I, Anexo).

A pesar de la variación observada en la concentración de urea, tanto en el tratamiento de hipoxia como en el de normoxia, se puede observar un incremento por efecto de la hipoxia (Fig. 5), presentando un promedio de concentración de urea de $13.35 \pm 5.18 \mu\text{g/L}$ en dicho tratamiento, a diferencia del obtenido en normoxia donde el promedio fue de $2.68 \pm 2.1 \mu\text{g/L}$. Ya que el tanque CA (sin organismos) presentó una concentración de urea de $0 \mu\text{g/L}$ (Tabla I, Anexo), la concentración de urea observada durante el experimento se atribuye a la excreción de los organismos.

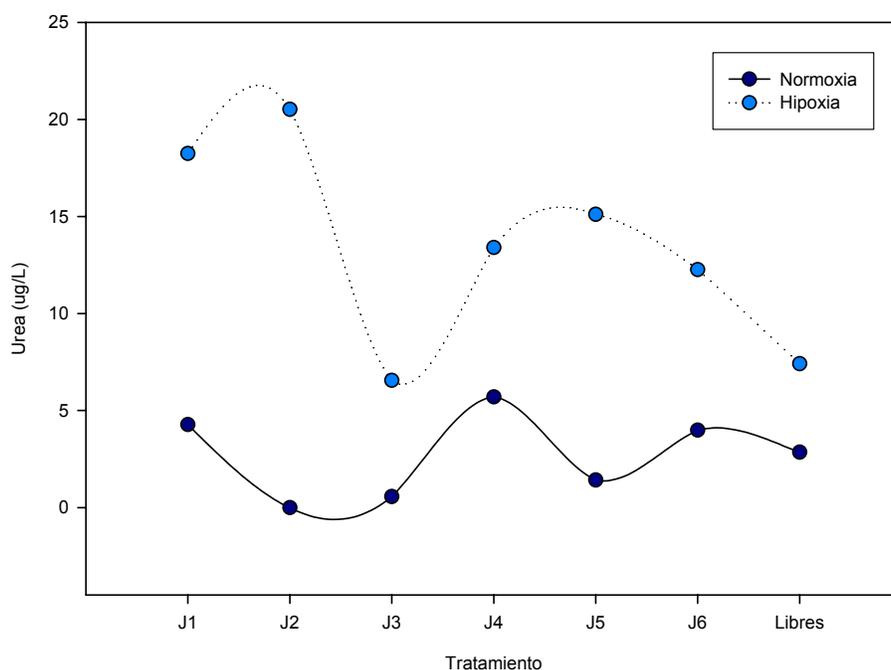


Fig.5. Concentración de urea ($\mu\text{g/L}$) en los tanques N y H. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en el tratamiento de normoxia niveles de oxígeno $> 5 \text{ mg/L}$ y en el caso de hipoxia niveles de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 mg/L respectivamente, en el caso de los libres en hipoxia el nivel fue de 0.3 mg/L .

La concentración de amonio también se incrementó cuando los camarones fueron sometidos a ejercicio (3.540 mg/L) a diferencia de la obtenida cuando se muestreo el grupo control (0.0779 mg/L) (Tabla I, Anexo), observando una tendencia similar a la presentada por la urea. A pesar de esto, la concentración de amonio en los tanques fue reducida por el tratamiento de hipoxia (0.200 ± 0.0717 mg/L) cuando la concentración de oxígeno disuelto en el agua fue menor a 1 mg/L (jaula 4). En comparación con el tratamiento de normoxia (0.354 ± 0.042 mg/L), en donde el nivel de oxígeno se mantuvo por arriba de 5.0 mg/L (Fig.6). En promedio la concentración de amonio en el tratamiento de normoxia fue de 0.292 ± 0.0813 mg/L y en el tratamiento de hipoxia fue de 0.197 ± 0.0811 mg/L, lo que equivale a una reducción del 32.25 % en la concentración total de amonio, reflejada en la excreción de éste en el tanque H. Por su parte los niveles de amonio obtenidos en el tanque CA (control de agua) fueron de 0.016 mg/L.

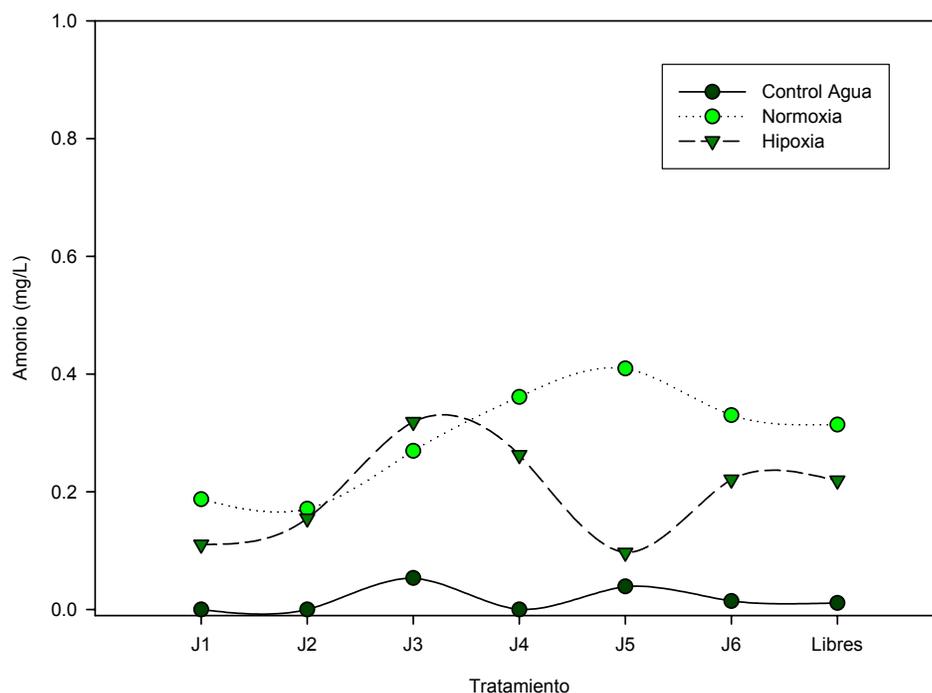


Fig.6. Concentración de amonio (mg/L) en los tanques N, H y CA. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en el tratamiento de normoxia niveles de oxígeno >5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en el caso de los libres en hipoxia el nivel fue de 0.3 mg/L.

En el caso de los nitritos, los niveles se incrementaron durante el ejercicio (1.933 $\mu\text{M/L}$) a diferencia de los presentados por el grupo control (0.908 $\mu\text{M/L}$), y el tanque CA 0.4391 $\mu\text{M/L}$ (Tabla I, Anexo). Tanto el tratamiento de hipoxia como el de normoxia presentaron un patrón muy similar por lo que se asume que en ambos casos, la respuesta se dio de forma independiente al nivel de oxígeno (Fig. 7). Sin embargo, en el caso del tratamiento de normoxia, los niveles de nitritos después del período de ejercicio fueron mayores (0.862 $\mu\text{M/L}$) al obtenido con el tratamiento de hipoxia (0.442 $\mu\text{M/L}$) (Tabla I, Anexo). En los organismos libres, se observó un incremento en la excreción de los nitritos en ambos tratamientos, aunque en el caso del tratamiento de hipoxia (1.14 $\mu\text{M/L}$), los niveles fueron superiores a aquellos presentados en el tratamiento de normoxia (0.67 $\mu\text{M/L}$).

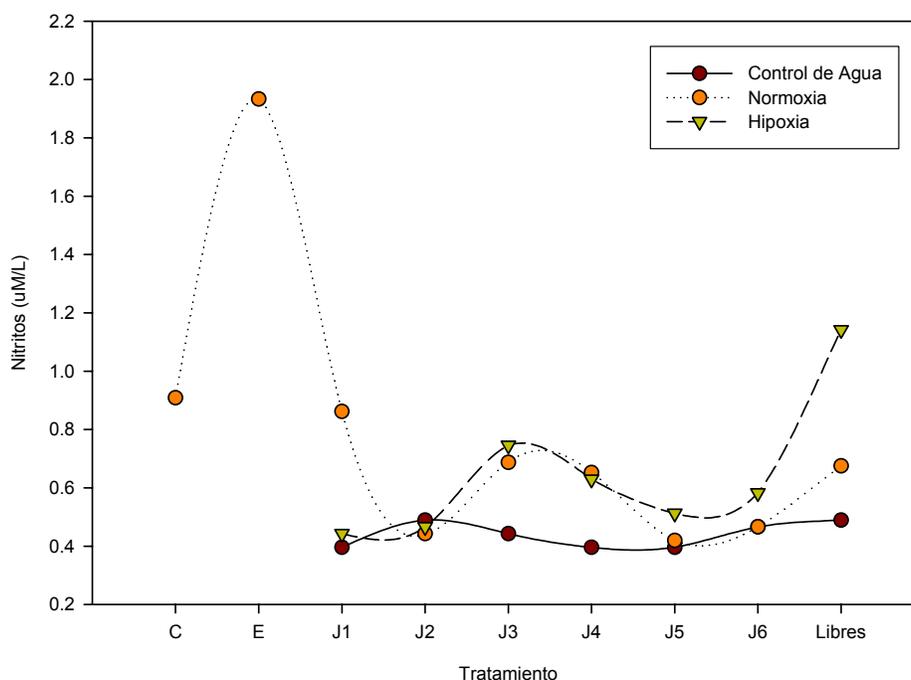


Fig. 7. Concentración de nitritos ($\mu\text{M/L}$) en la tina de aclimatación (grupo C), ejercicio (grupo E) y en los tanques N, CA y H. El grupo C, E, las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno >5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en el caso de los libres en hipoxia el nivel fue de 0.3 mg/L.

La concentración de los nitratos en el agua cuando se muestreo el grupo control fue de cero (Tabla I, Anexo), incrementándose con el ejercicio a $0.36 \mu\text{M/L}$. Por su parte el control de agua presentó un nivel de nitratos de $0.01 \mu\text{M/L}$. En el caso de los tratamientos de hipoxia y normoxia, los niveles de nitratos fueron similares, en promedio de $0.045 \pm 0.071 \mu\text{M/L}$ y $0.041 \pm 0.0781 \mu\text{M/L}$ respectivamente (Fig. 8).

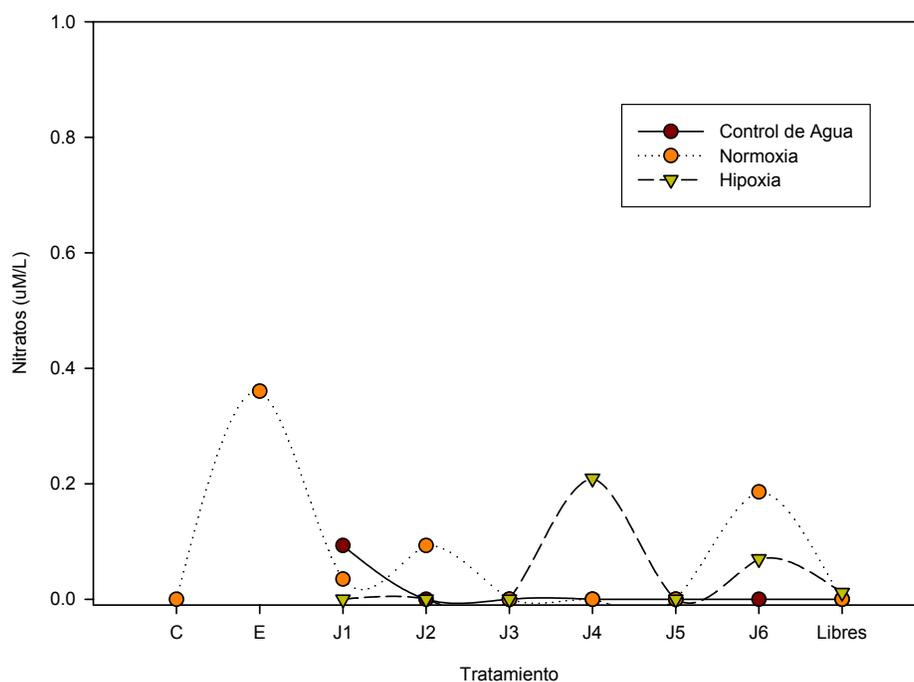


Fig. 8. Concentración de nitratos ($\mu\text{M/L}$) en la tina de aclimatación (grupo C), ejercicio (grupo E) y en los tanques N, CA y H. El grupo C, E, las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno $>5 \text{ mg/L}$ y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en el caso de los libres en hipoxia el nivel fue de 0.3 mg/L.

7.3 Variables Fisiológicas en Hemolinfa de Camarón.

Los resultados de las mediciones de ácido láctico y glucosa en hemolinfa, indican que el tratamiento de hipoxia en niveles de oxígeno menores a 0.5 mg/L inducen un incremento en los niveles de ambas variables fisiológicas de forma significativa, alcanzando sus niveles máximos en concentraciones de oxígeno menores a 0.32 mg/L, lo que implica que a ese nivel de oxígeno se produjo el paro metabólico aeróbico.

7.3.1. Niveles de Ácido Láctico en Hemolinfa.

El ácido láctico en la hemolinfa presentó diferencias estadísticamente significativas debidas a una disminución en la concentración de oxígeno en el tratamiento de hipoxia (tanques H y RH), teniendo una **F** y una **p** de $F_{(15,70)}=44.017$, $p=0.000$ y de $F_{(13,67)}=22.326$, $p=0.00$, respectivamente (Fig. 9 y 10). El ácido láctico en el grupo control (2.235 ± 1.67 mg/dL), ejercicio (2.551 ± 1.67 mg/dL) y en el tratamiento de normoxia (4.174 ± 1.3 mg/dL) donde el nivel de oxígeno se mantuvo arriba de 5.6 mgO₂/L, no se vio afectado significativamente ($p>0.05$) (Tabla II, Anexo).

En el tratamiento de hipoxia (tanques H y RH), se observó un incremento estadísticamente significativo en el ácido láctico conforme el nivel de oxígeno en los tanques fue descendiendo (Fig. 9 y 10). Sin embargo, esto no ocurrió cuando el nivel de oxígeno fue superior a 1 mg/L (Fig. 9 y 10). Observando que cuando el nivel de oxígeno cayó por debajo de 1 mg/L en el agua (J4, J5, J6 y Libres) los niveles de ácido láctico se incrementan en los organismos en ambos tanques, teniendo un efecto estadísticamente significativo ($p=0.00$) cuando la concentración de oxígeno se encuentra por debajo de 0.5 mg/L (Fig. 9 y 6), los niveles de ácido láctico fueron de 32.043 ± 2.64 mg/dL y 41.207 ± 2.27 mg/dL en los organismos de la J6 de los tanques H y RH, respectivamente (Tabla II, Anexo).

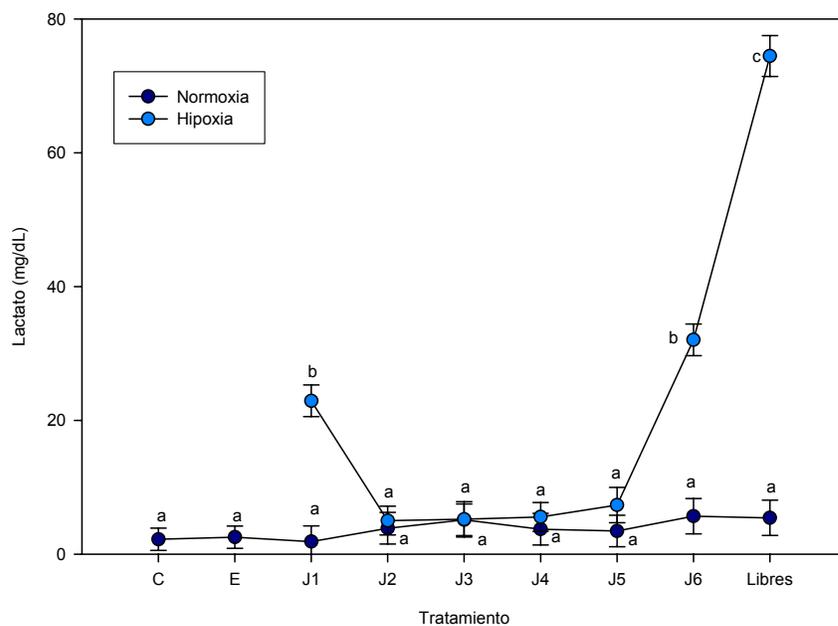


Fig. 9. Nivel de ácido láctico (mg/dL) en hemolifa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque H). Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno >5 mg/L y en el caso de Hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en el caso de los libres en hipoxia el nivel fue de 0.3 mg/L. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

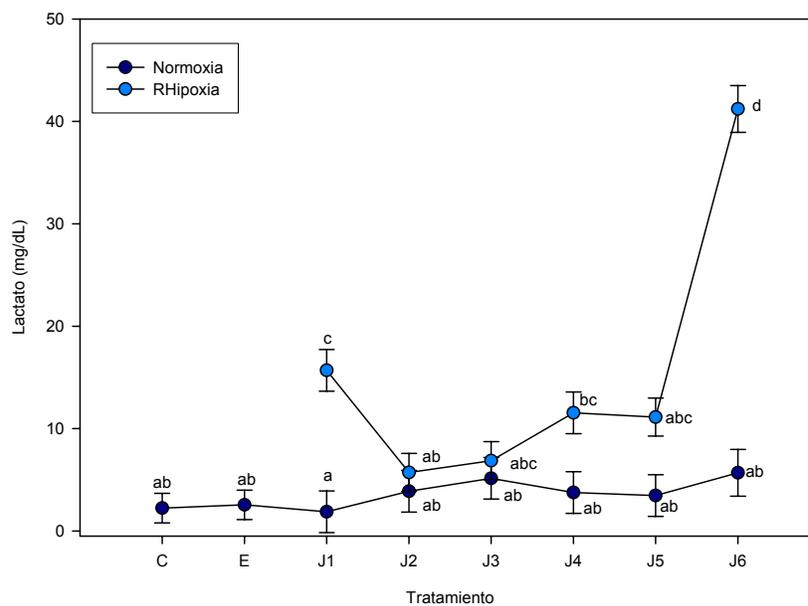


Fig. 10. Nivel de ácido láctico (mg/dL) en hemolifa en grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque RH). Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en Normoxia niveles de oxígeno >5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En los organismos libres presentes en el tanque H, se observó el máximo nivel de ácido láctico registrado en todo el experimento (74.45 ± 3.05 mg/dL) cuando el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L (Fig. 9), a diferencia de los organismos enjaulados del mismo tanque cuando el nivel de oxígeno fue de 0.32 mg/L (J6), ya que los organismos libres presentaron movimiento durante el curso del experimento (Tabla II, Anexo). No obstante, al no haber organismos libres en el tanque RH el máximo nivel de ácido láctico registrado fue de 41.20 mg/dL en los organismos de la J6 (Tabla II, Anexo) cuando el nivel de oxígeno fue de 0.32 mg/L. Cabe notar que el nivel de ácido láctico en los organismos de la J1 del tanque H y RH (nivel de oxígeno de 3.72 y 3.78 mg/L respectivamente) fue mayor al presentado por los organismos de la J1 del tanque N donde el nivel de oxígeno fue de 5.64 mg/L. Teniendo que el nivel de ácido láctico se incrementó de 1.87 ± 2.36 mg/dL en el tanque N, a 22.92 ± 2.36 mg/dL y 15.681 ± 2.03 mg/dL en los tanques H y RH respectivamente, debido a un efecto post-ejercicio que se presentó sólo en el tratamiento de hipoxia (Fig. 9 y 10).

7.3.2. Niveles de Glucosa en Hemolinfa.

Los niveles de glucosa en la hemolinfa, presentaron una tendencia similar a la presentada por el ácido láctico, observando un efecto significativo provocado por la disminución en la concentración de oxígeno en los dos tanques de hipoxia (H y RH), con una **F** y una **p** de, $F_{(15,77)} = 36.638$, $p=0.000$ y $F_{(13,67)} = 13.515$, $p=0.00$ respectivamente (Fig. 11 y 12). En ambos tanques, el nivel de glucosa en el grupo control (11.813 ± 1.44 mg/dL), ejercicio (17.913 ± 1.52 mg/dL) y en el tratamiento de normoxia (organismos de la J2-Libres) no se modificó de forma estadísticamente significativa ($p > 0.05$) presentando un máximo de 18.24 ± 1.86 mg/dL en los organismos de la J2 y un mínimo en el grupo control (C) (Tabla II, Anexo).

Los únicos organismos que presentaron diferencias significativas en el tratamiento de normoxia, fueron los de la J1 donde se observó un incremento importante (29.88 ± 1.86

mg/dL), en comparación con los grupos C, E, J2 –J6 y Libres en el mismo tratamiento. Incluso este grupo de organismos presentó un nivel de glucosa más alto que el obtenido en por los organismos de la J1 de los tanques H y RH (23.6 ± 2.27 mg/dL y 25.9 ± 2 mg/dL, respectivamente), pero sin presentar diferencias estadísticas significativas (Fig.11 y 12). No obstante, esta tendencia de incremento en los niveles de glucosa post-ejercicio en los organismos de la J1 se presentó en todos los tanques (N, H y RH).

En el tratamiento de hipoxia conforme el oxígeno disminuyó se observó un incremento significativo en los niveles de glucosa en la hemolinfa, en los tanques H y RH. En el tanque H cuando la concentración de oxígeno fue superior a 1 mg/L la concentración de glucosa en la hemolinfa no se vió modificada, pero cuando el oxígeno fue menor a 0.5 mgO₂/L (J5) se observó un incremento estadísticamente significativo (Fig. 11). A partir de este nivel (<0.5 mgO₂/L) en el mismo tanque se observaron niveles de glucosa de 33.13 ± 1.86 mg/dL (J5), los cuales se incrementaron cuando el oxígeno disminuyó (0.32 mg/dL) llegando a 40.97 ± 1.7 mg/dL de glucosa (en los organismos de la J6). No obstante, el máximo nivel de glucosa se observó en los organismos libres (57.68 ± 2.2 mg/dL) con condiciones de oxígeno de 0.3 mg/L (Fig. 7). Lo que demuestra que existen diferencias en la concentración de glucosa en la hemolinfa debidas al nivel de oxígeno, así como por efecto del movimiento que los organismos libres presentaron, ya que a pesar de encontrarse en condiciones de oxígeno muy similares (libres y los de la J6) la concentración de glucosa fue diferente.

Sin embargo, en el caso del tanque RH los niveles de glucosa máximos fueron registrados en los organismos de la J6 cuando el nivel de oxígeno fue de 0.32 mg/L con una concentración de glucosa fue de 38.232 ± 2.04 mg/dL (Fig. 12), debido a que en este tanque no se mantuvieron organismos libres a comparación del tanque H.

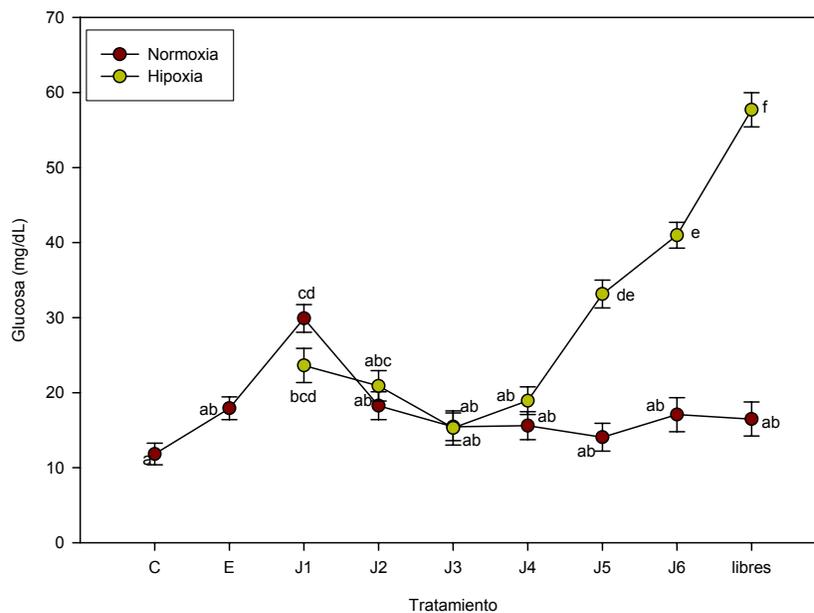


Fig. 11. Nivel de glucosa (mg/dL) en hemolinfa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque H). Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno >5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en el caso de los libres en hipoxia el nivel fue de 0.3 mg/L. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

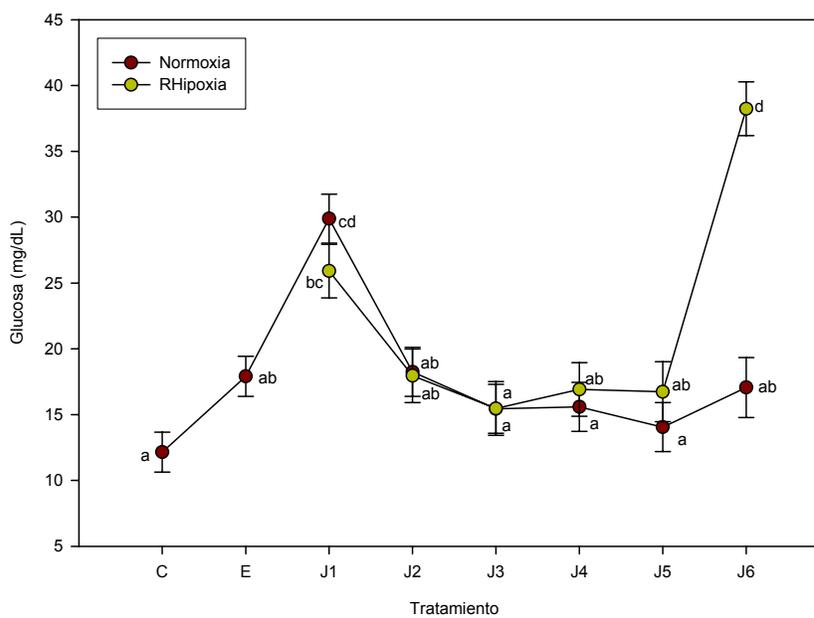


Fig. 12. Nivel de glucosa (mg/dL) en hemolinfa en grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia (tanque N) e hipoxia (tanque RH). Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en Normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la figura 6 (Anexo) se puede observar como los niveles de ácido láctico y glucosa están relacionados de manera estadísticamente significativa, con una $p=0.0093$ y una $R^2=0.64665$. Ambas variables se ven modificadas cuando el nivel de oxígeno se encuentra por debajo de 0.5 mg/L , en los tanques H y R, así como cuando los organismos son sometidos a ejercicio y cuando estos se encuentran en movimiento libres a diferencia de los organismos enjaulados (con poca movilidad) (Fig. 11 y 12). En resumen en la figura 13 se puede observar cómo los niveles de ácido láctico (lactato) y glucosa son modificados por efecto de la hipoxia y del ejercicio.

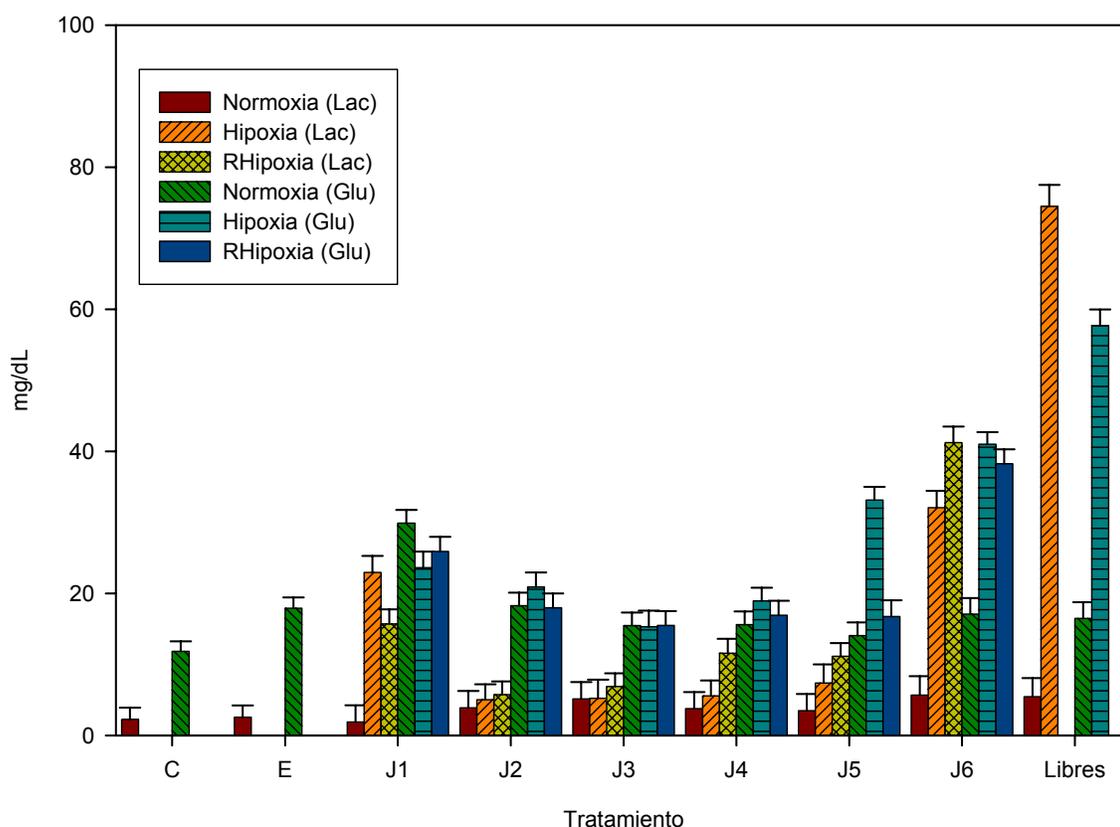


Fig. 13. Nivel de ácido láctico (Lac) y glucosa (Glu) en mg/dL en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tanques N, H y RH. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno de $> 5 \text{ mg/L}$ y en el caso de H y RH de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en el caso de los libres en hipoxia el nivel fue de 0.3 mg/L .

7.3.3. Niveles de colesterol en hemolinfa en el grupo control, ejercicio, normoxia e hipoxia.

El nivel de colesterol (mg/dL) no se vio modificado estadísticamente ($F_{(13,66)}=1.8469$, $p=0.05368$) en el tratamiento de hipoxia, cuando fue comparado con el grupo (C), (E) y N. Dichos niveles de colesterol se mantuvieron entre 2.26 mg/dL como mínimo en el grupo C, y 3.13 mg/dL como máximo en los organismos de la J3 del tanque N (Fig. 14).

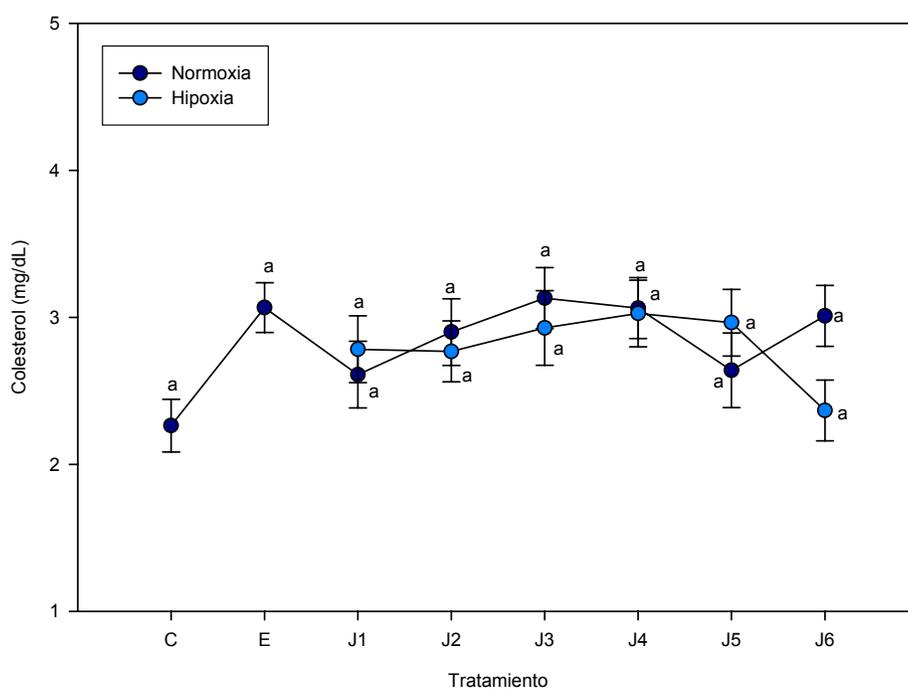


Fig. 14. Nivel de Colesterol (mg/dL) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

7.3.4. Nivel total de proteína soluble en hemolinfa.

Los niveles de proteína no se vieron modificados de forma estadísticamente significativa ($F_{(13,74)}=1.3671$, $p=0.19600$) en ninguno de los tratamientos (normoxia e hipoxia), ni en los grupos control y ejercicio. Se tuvo promedio de 99.65 mg/mL, donde la máxima concentración de proteína se encontró en los organismos de la J1 del tratamiento de hipoxia y la mínima en los de la J5 del tratamiento de normoxia con 78.90 mg/mL (Fig. 15).

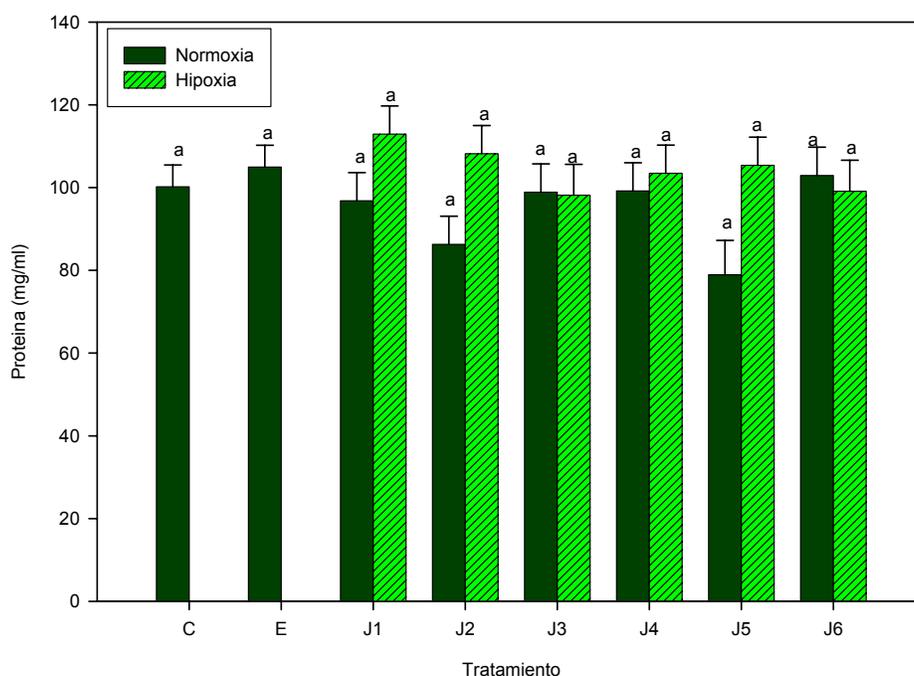


Fig. 15. Nivel de Proteína (mg/mL) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.4 Variables asociadas al sistema inmune del Camarón.

7.4.1. Actividad de fenoloxidasa total (FO Tot).

La actividad de la Fenoloxidasa Total (FO Tot) se vio modificada significativamente ($F_{(15,77)}=7.6577$, $p=0.0000$) por efecto del nivel de oxígeno, con un promedio de actividad de 0.164108 unidades de actividad FO, en donde la máxima actividad se encontró en los organismos de la J1 del tanque N (0.319 ± 0.02 unidades de actividad FO) y la mínima en los de la J6 del tanque H (0.04 ± 0.02 unidades de actividad FO) (Tabla III, Anexo). Se observó que la actividad de la FO Tot disminuyó a partir de la J5, cuando el oxígeno fue menor a 0.5 mg/L, alcanzando los niveles más bajos cuando el oxígeno fue igual a 0.32 mg/L en los organismos de la J6 y 0.3 mg/L en los organismos libres (0.06 ± 0.027 unidades de actividad FO) (Fig.16).

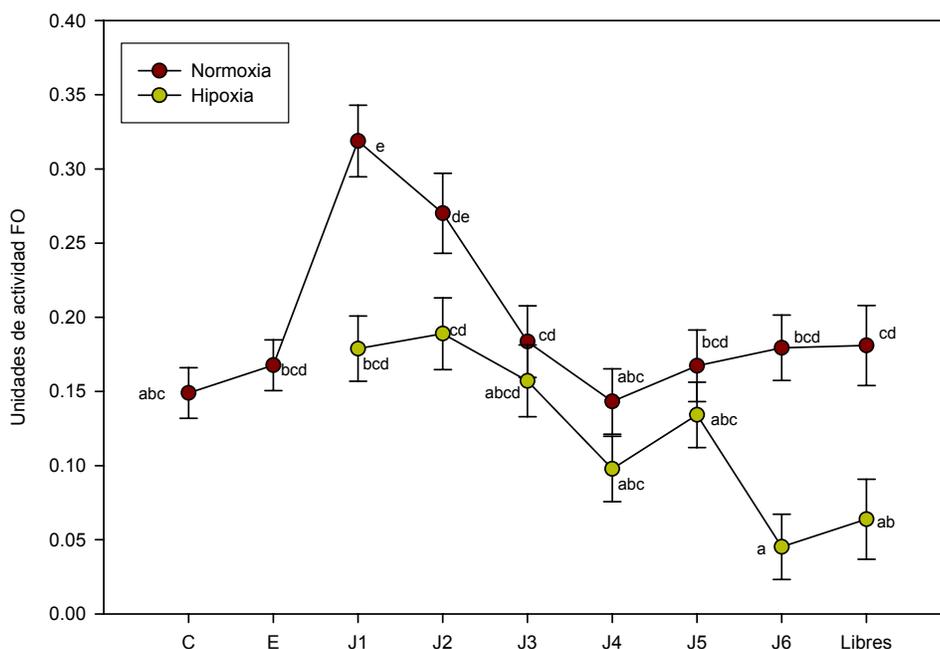


Fig. 16. Nivel de Fenoloxidasa Total en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de normoxia e hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Al comparar los grupos (C), (E), con los organismos de la J6 de los tratamientos de normoxia e hipoxia, así como los organismos libres, se encontró un efecto estadísticamente significativo estadísticamente en la actividad de la FO Tot y el nivel de oxígeno ($F_{(5,34)}=6.8644$, $p=0.00016$). Registrando la actividad más baja de la FO Tot en la J6 y en los organismos libres cuando los niveles de oxígeno fueron de 0.32 y 0.3 mg/L respectivamente (Fig. 17).

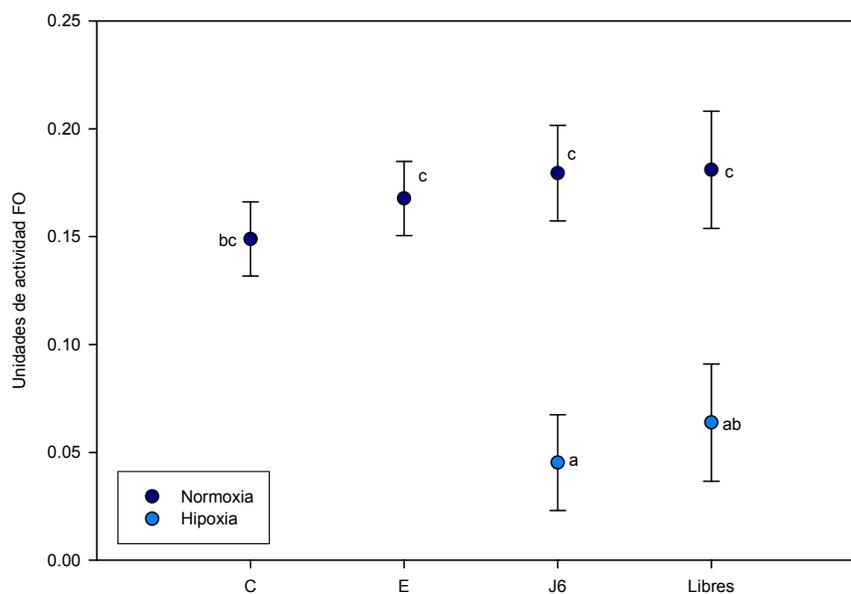


Fig. 17. Nivel de Fenoloxidasa Total en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia niveles de 0.32 y 0.3 mg O₂/L respectivamente. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.4.2. Actividad de Fenoloxidasa (FO).

La actividad de la Fenoloxidasa (FO) no se vio modificada significativamente ($F_{(15,80)}=1.5128$, $p=0.12046$) en ninguno de los tratamientos (normoxia e hipoxia), ni en los grupos control y ejercicio, al tener un promedio de 0.036 unidades de actividad FO. La máxima actividad se encontró en los organismos de la J1 del tratamiento de normoxia (0.04 ± 0.004 unidades de actividad FO) y la mínima en los de la J6 del tratamiento de hipoxia (0.02 ± 0.004 unidades de actividad FO) (Tabla III, Anexo). Sin embargo, aunque no

se presentan diferencias estadísticamente significativas debidas a la variación en la actividad de la FO dentro de los tratamientos, se puede observar una tendencia, en la actividad de la FO a disminuir a partir de los organismos de la J5 cuando el oxígeno fue menor a 0.5 mg/L, registrándose los niveles más bajos cuando el nivel de oxígeno fue igual a 0.32 mg/L en los camarones de la J6 y 0.3 mg/L en los organismos libres (0.0288±0.005 unidades de actividad FO) aunque no de forma significativa (Fig. 18).

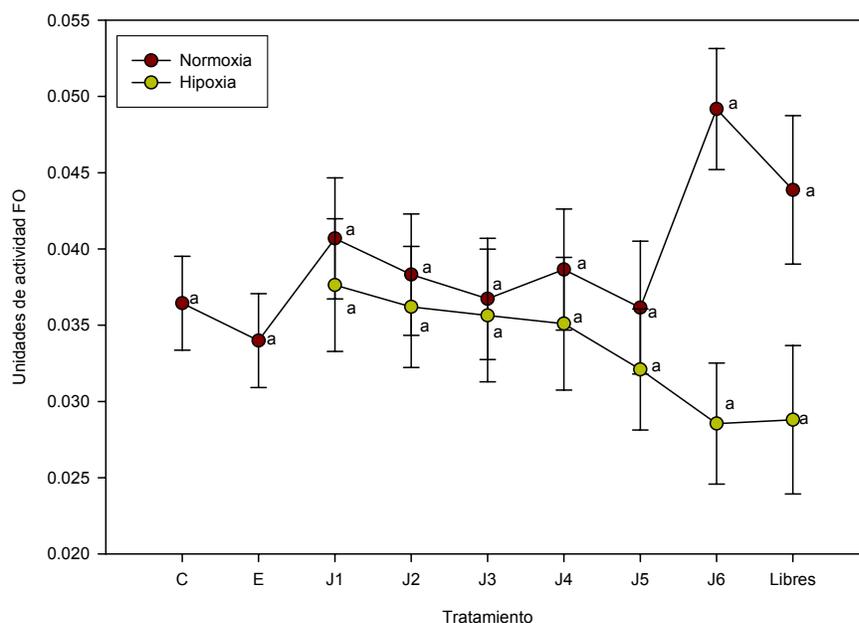


Fig. 18. Actividad de la Fenoloxidasas en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Considerando sólo el grupo control (C), (E), los organismos de la J6 de los tratamientos de normoxia e hipoxia, así como los organismos libres, se encontró un efecto significativo estadísticamente en la actividad de la FO y el nivel de oxígeno ($F_{(5,34)}=6.6131$, $p=0.00021$). Se observó la actividad más baja de la FO en los camarones de la J6 y en los libres del tratamiento de hipoxia (Fig. 19). Encontrando que cuando los niveles de oxígeno son menores a 0.5 mg/L la actividad de la FO se ve disminuida. Aunque el ANOVA de una vía no registra diferencias estadísticas entre el grupo C y la última jaula del tratamiento de

hipoxia, la prueba *t* de student demuestra que si hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y la J6 ($p= 0.0299$), pero no con el grupo E.

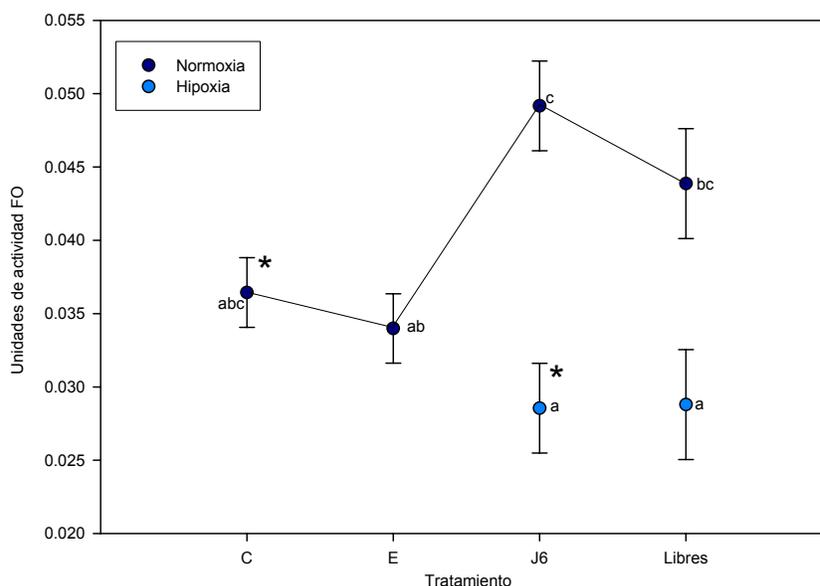


Fig. 19. Actividad de la Fenoloxidasa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia niveles de <0.5 . En los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0.05$) En los casos en que los datos de los tratamientos fueron diferentes significativamente (*t* de student, $p<0.05$) se indica con un asterisco.

7.4.3. Actividad de proFenoloxidasa (proFO).

La actividad de la proFenoloxidasa (proFO) presentó una tendencia similar a la FO total al verse estadísticamente modificada ($F_{(15,77)}=7.2210$, $p=0.0000$) por el tratamiento de hipoxia y ejercicio. Se observó un promedio de actividad de proFO de 0.13308 unidades de actividad FO, encontrando una máxima actividad en los organismos de la J1 del tratamiento de normoxia (0.27 ± 0.027 unidades de actividad FO) y el mínimo en los de la J6 del tratamiento de hipoxia (0.01 ± 0.024 unidades de actividad FO) (Tabla III, Anexo). Es claro que la actividad de la proFO disminuyó a partir de la J5 (0.102 ± 0.024 unidades de actividad FO) cuando el nivel de oxígeno fue menor a 0.5 mg/L, alcanzando los niveles más bajos cuando el oxígeno fue igual a 0.32 mg/L en la J6 de la misma manera que la FO Tot (Fig. 20).

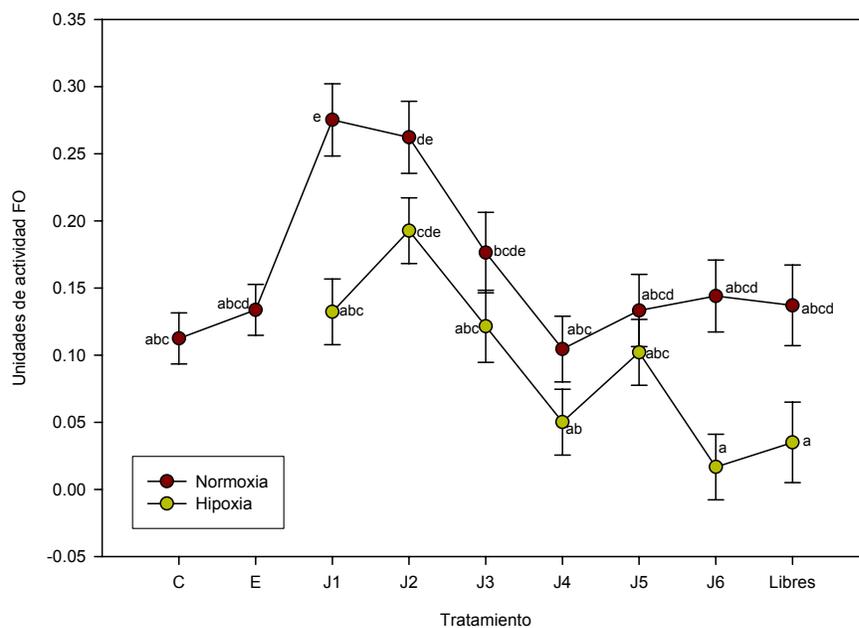


Fig. 20. Actividad de la proFenoloxidasa (proFO) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Comparando el grupo (C), (E), la J6 de los tratamientos de normoxia e hipoxia, y los organismos libres, se encontró un efecto estadísticamente significativo en la actividad de la proFO por el nivel de oxígeno ($F_{(5,33)}=6.4715$, $p=0.00027$). Se registró la actividad más baja de la proFO en los camarones de la J6 (0.0166 ± 0.024 unidades de actividad FO) y en los libres (0.035 ± 0.030 unidades de actividad FO) cuando los niveles de oxígeno fueron de 0.32 y 0.3 mg/L (Tabla III, Anexo). Esto sugiere que cuando los niveles de oxígeno se encuentran por debajo de 0.5 mg/L, la actividad de la proFO disminuye (Fig. 21).

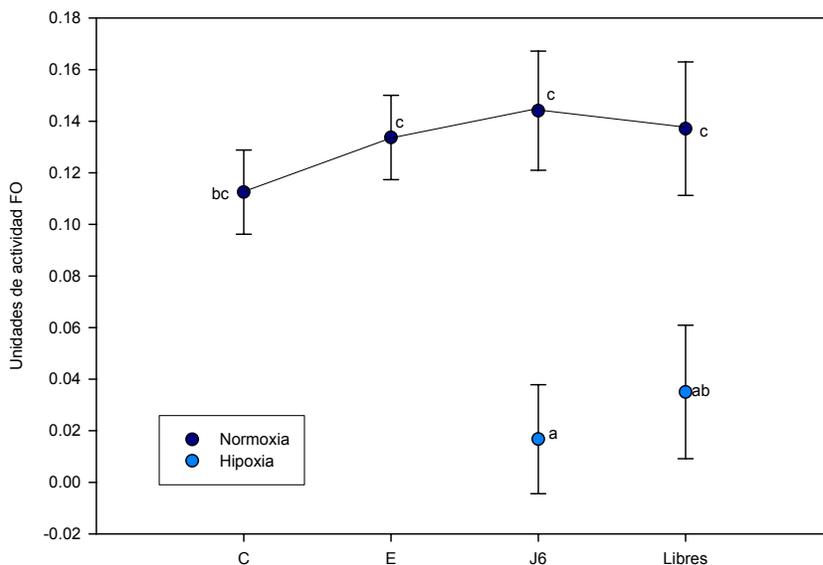


Fig. 21. Nivel de proFenoloxidasa en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno de > 5 mg/L y en el caso de hipoxia niveles de 0.32 y 0.3 mg O_2/L respectivamente. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

8.4.4. Actividad de $\alpha 2$ -Macroglobulina ($\alpha 2M$).

La actividad de la $\alpha 2M$, se modificó estadísticamente ($F_{(13,72)}=6.4314$, $p=0.00$) debido al nivel de oxígeno presente en el agua y por el ejercicio. Con un promedio general de actividad de 20.44 μg de Trip/ $\alpha 2M$. La máxima actividad se encontró en los organismos de la J3 del tratamiento de hipoxia con un valor promedio de 27.66 μg de Trip/ $\alpha 2M$ y el mínimo en los camarones de la J5 con un valor de 14.67 μg de Trip/ $\alpha 2M$ (Tabla III, Anexo). La actividad de la $\alpha 2M$ disminuyó en el grupo de ejercicio (19.002 ± 1.33 μg de Trip/ $\alpha 2M$), así como en los dos tratamientos de normoxia e hipoxia en general. En el tanque N y en el grupo E, la actividad de la $\alpha 2M$ se mantuvo alrededor de 17.913 μg de Trip/ $\alpha 2M$ en promedio a diferencia de la obtenida en el grupo control (27.491 ± 21.4 μg de Trip/ $\alpha 2M$), con una tendencia de descenso en la actividad de la $\alpha 2M$ tanto en el tanque N como en el grupo E (Fig. 22).

En el caso del tratamiento de hipoxia la actividad de la $\alpha 2M$ se incrementó en los organismos de la J2 con un nivel de oxígeno de 2.97 mg/L, alcanzando el mismo nivel que el grupo control en los de la J3 y 4 (27.66 ± 1.88 y 26.92 ± 2.1 μg de Trip/ $\alpha 2M$, respectivamente), las cuales se mantuvieron en niveles de oxígeno superiores a 1.93 mg/L. Cuando el nivel de oxígeno descendió por debajo de 0.5 mg/L, la actividad de $\alpha 2M$ disminuyó nuevamente, teniendo que los organismos de la J5 y J6 de los tratamientos de normoxia e hipoxia presentan valores muy similares a pesar de presentar niveles de oxígeno diferentes (Fig.22).

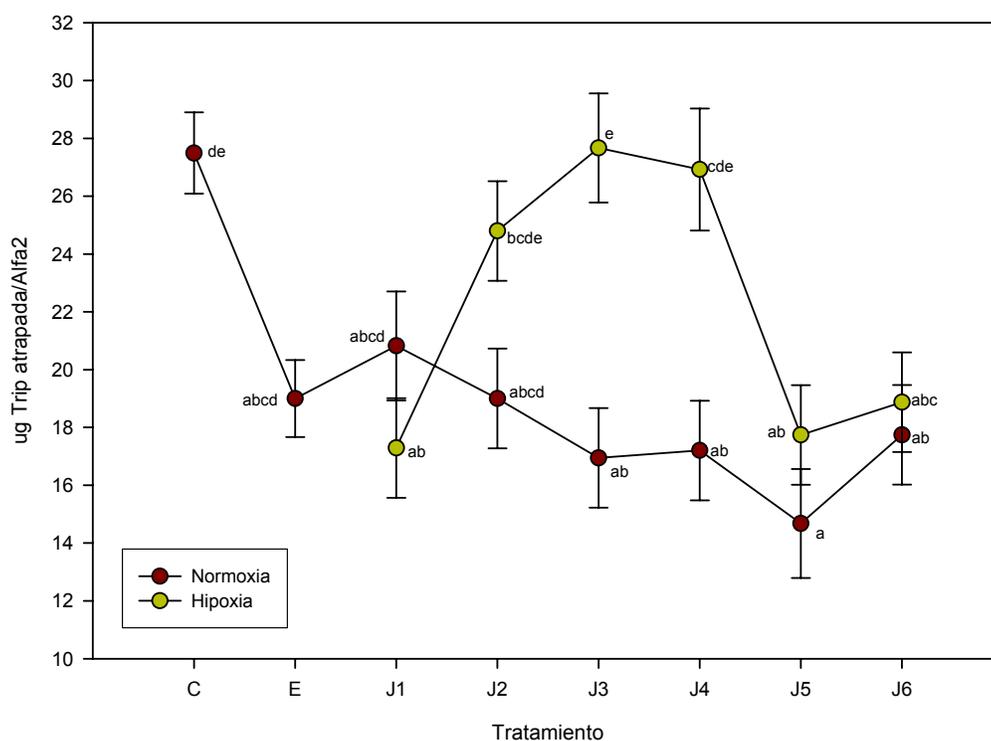


Fig. 22. Actividad de la $\alpha 2$ -Macroglobulina (μg de Tripsina/ $\alpha 2M$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.4.5. Cuento Total de Hemocitos.

El conteo total de hemocitos (CTH) presentó diferencias estadísticas significativas ($F_{(13,67)}=8.6410$, $p=0.00$) por efecto del nivel de oxígeno en el agua y el ejercicio, con promedio general de hemocitos totales de $12.5457 \text{ cel} \times 10^6$, con un máximo de $18.77 \text{ cel} \times 10^6$ en los organismos de la J1 del tratamiento de hipoxia y con un mínimo en los de la J6 del mismo tratamiento con un promedio de $5.522 \text{ cel} \times 10^6$ (Tabla IV, Anexo). La cantidad de hemocitos totales cuando el oxígeno se mantuvo por arriba de los 5.0 mg/L en el grupo control, en el grupo de ejercicio y en el tratamiento de normoxia presentó variaciones, mostrando un ligero incremento a través del tiempo que duró el experimento, pero sin presentar diferencias significativas (Fig. 23a).

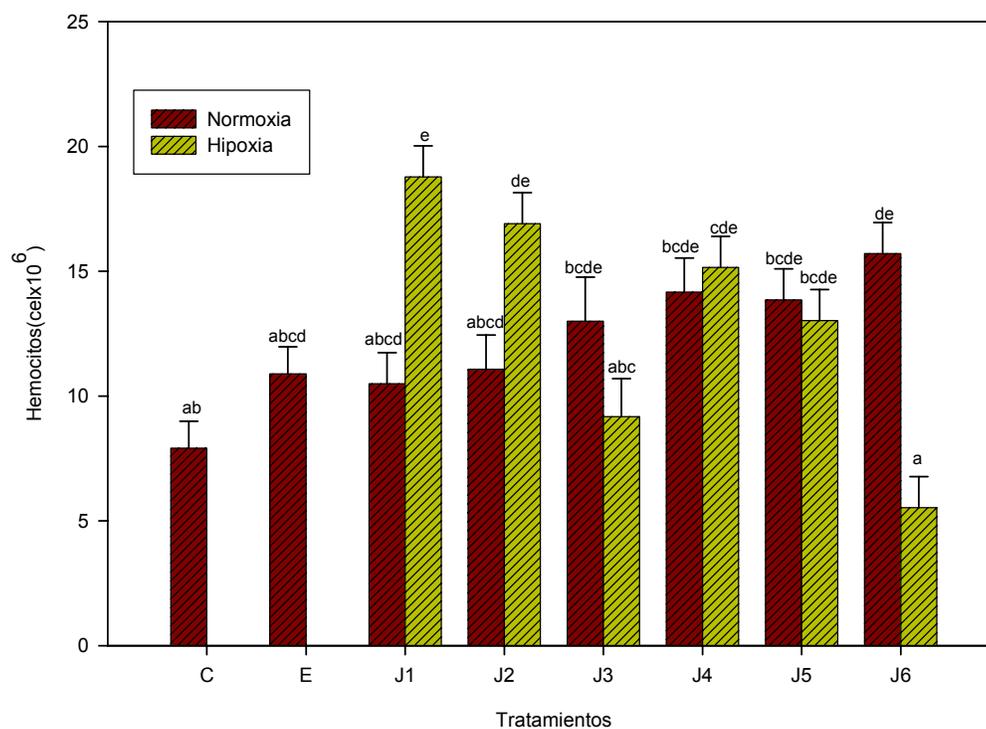


Fig. 23a. Cuento Total de Hemocitos ($\text{cel} \times 10^6$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno de $> 5 \text{ mg/L}$ y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L . Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el caso del tratamiento de hipoxia se presentó el CTH presentó un incremento en los organismos de la J1, en donde el nivel de oxígeno fue de 3.72 mg/L, sin embargo, conforme disminuye el oxígeno se presenta una tendencia de reducción en el CTH. En los organismos de la J6 del tratamiento de hipoxia se presentaron los CTH y el nivel de oxígeno más bajos (Tabla IV, Anexo), a pesar de esto, este grupo de organismos no presentó diferencias estadísticas con el grupo control, el grupo de ejercicio y los organismos de las J1 y J2 del tratamiento de normoxia, en donde los niveles de oxígeno nunca bajaron de 5.0 mg/L (Fig. 23a).

Bajo las mismas condiciones de oxígeno el ejercicio incrementó ligeramente los CTH, donde el grupo C y el grupo E presentaron un CTH en promedio de $7.9125 \text{ cel} \times 10^6$ y $10.889 \text{ cel} \times 10^6$ respectivamente ($p= 0.007244$, Fig. 23b).

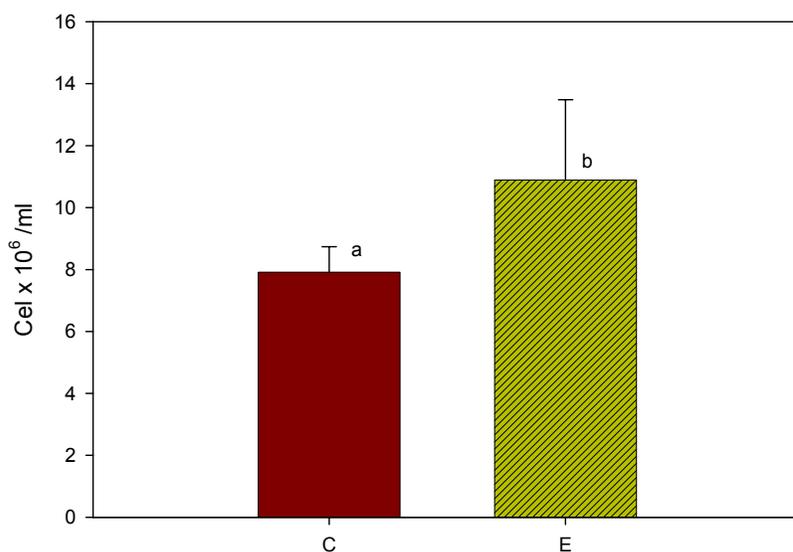


Fig. 23b. Conteo Total de Hemocitos ($\text{cel} \times 10^6$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) donde el nivel de oxígeno de fue mayor de 5 mg/L en ambos grupos. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.4.6. Actividad de Lisozima.

La actividad de lisozima (Act/min/mg), presentó diferencias estadísticas significativas entre el grupo C y la J6 del tratamiento de hipoxia ($p=0.0017$, Fig.24). Cuando el nivel de oxígeno cayó de 5.82 mg/L (grupo control) a 0.32 mg/L (J6) la actividad de la lisozima disminuyó de 2.35 (Act/min/mg) a 0.86 (Act/min/mg) respectivamente, lo cual corresponde a una reducción del 63.27 % en su actividad con respecto a la media.

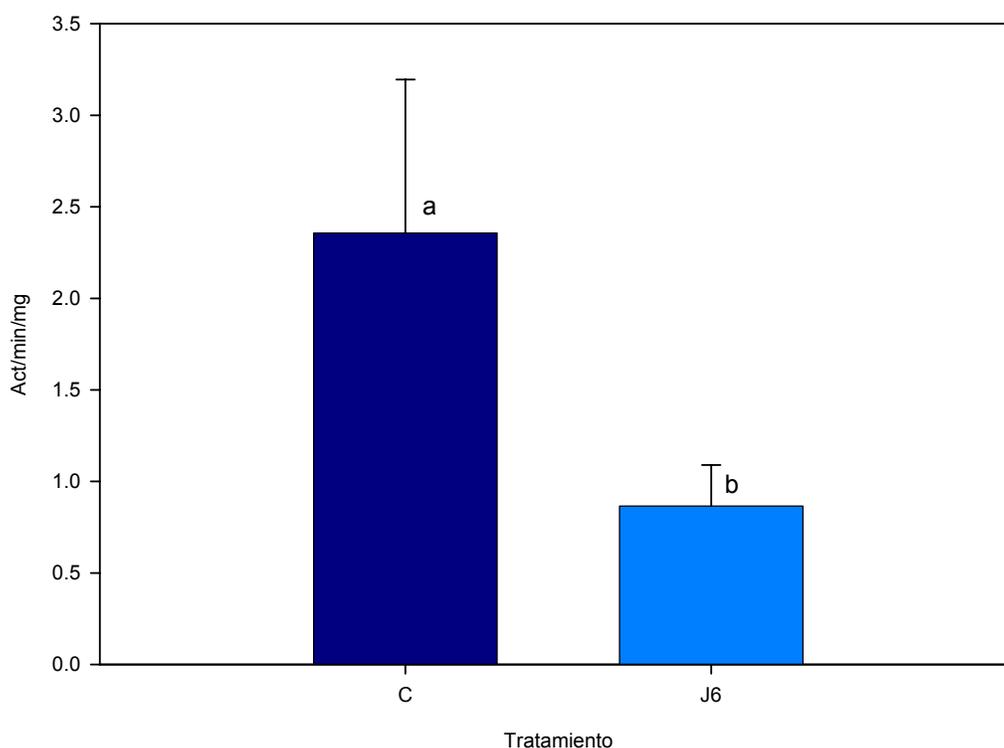


Fig. 24. Actividad de Lisozima (Act/min/mg) en el grupo control (C) y en la jaula 6 de Hipoxia. En el grupo control el nivel de oxígeno fue de 5.82 mg/L y en el caso de la jaula 6 de 0.32 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

7.4.7. Nitratos y Nitritos en Hemolinfa.

7.4.7.1 Nitritos en Hemolinfa ($\mu\text{M/L}$).

La concentración de nitritos en la hemolinfa presentó diferencias estadísticas significativas ($F_{(15,74)}=5.5347$, $p=0.00$), por efecto post-ejercicio y no por el nivel de oxígeno, ya que la concentración de nitritos en los tratamientos de normoxia e hipoxia se presentó de forma similar a pesar de presentar condiciones de oxígeno muy diferentes (Fig.25a). En el caso del grupo control, donde los organismos se mantuvieron bajo condiciones de reposo absoluto, se obtuvo una concentración promedio de nitritos de $1.90 \mu\text{M/L}$ y que en el presente trabajo es considerada como un nivel basal. A partir dicho nivel, la concentración promedio de nitritos incrementó de forma significativa ($p=0.0078$) (Fig. 25b y 26), en el grupo de organismos sometidos a ejercicio $2.63 \mu\text{M/L}$, la máxima concentración de nitritos registrada durante el experimento (Tabla V, Anexo). Debido a que en el grupo control y el de ejercicio se mantuvieron en niveles de oxígeno muy similares ($<5.7 \text{ mg/L}$), cabe la posibilidad que el efecto en la concentración promedio de nitritos es a causa del nado de los organismos durante dicho proceso de ejercicio y no debido al nivel de oxígeno.

Cuando los organismos se pusieron en reposo después del período de ejercicio, se observó un descenso en la concentración de nitritos en los organismos de las primeras 3 jaulas (J1, J2, J3) del tratamiento en normoxia y en hipoxia, mostrando en ambos casos un comportamiento similar. En el tratamiento de hipoxia la caída en la concentración de nitritos fue más evidente, resultando valores más bajos que los obtenidos en normoxia, en este tratamiento los organismos redujeron el movimiento por efecto de la hipoxia (Tabla V, Anexo) (Fig.25a).

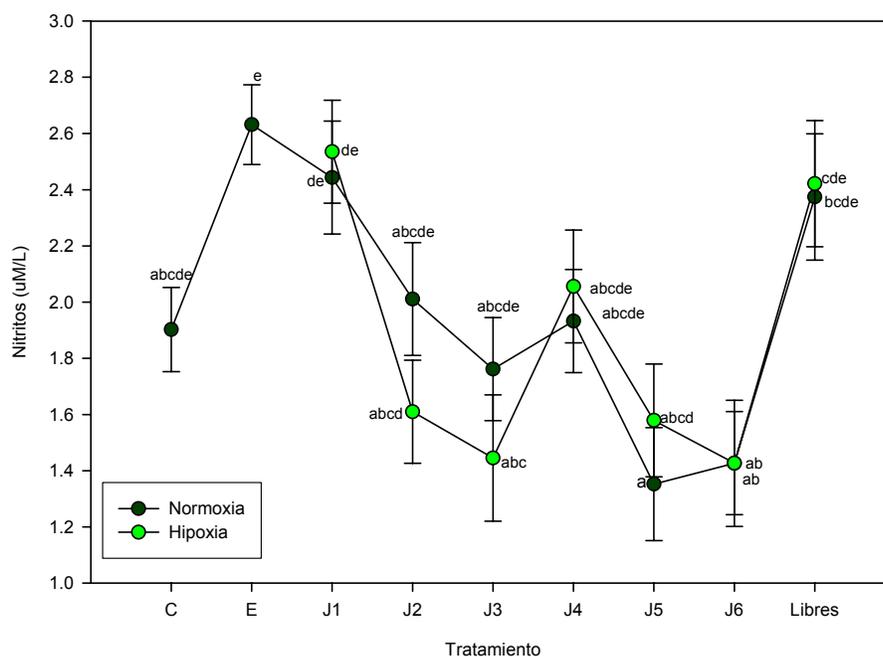


Fig. 25a. Concentración de nitritos ($\mu\text{M/L}$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. El grupo C, E y las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno > 5 mg/L y en el caso de hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

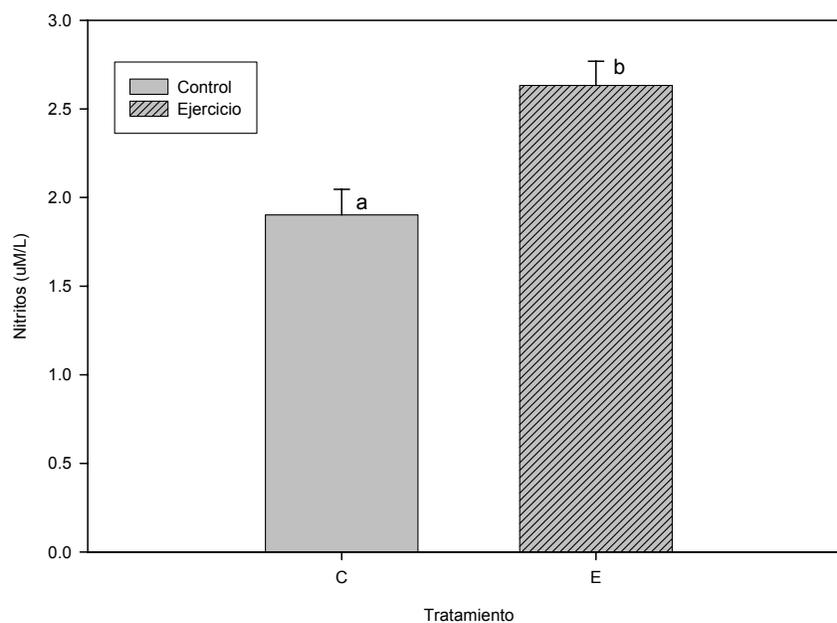


Fig. 25b. Nivel de nitritos ($\mu\text{g/L}$) en el grupo control (C) y en el grupo ejercicio (E), donde el nivel de oxígeno fue mayor de 5 mg/L en ambos grupos. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Dicha tendencia se mantuvo incluso en los organismos de la J4 del tratamiento de normoxia e hipoxia, presentándose un incremento que alcanzó la concentración de nitritos obtenida en el control a pesar de ello, en la J5 de ambos tratamientos los niveles de nitritos volvieron a caer hasta alcanzar el mismo nivel que los organismos de la J6 de ambos tratamientos, con un nivel de oxígeno de 0.32 mg/L en hipoxia y 5.68 mg/L en normoxia (Tabla V, Anexo).

Ahora bien, el comportamiento de los organismos libres fue diferente al presentado por los organismos enjaulados o en reposo. Ya que los primero se mantuvieron en movimiento durante todo el experimento, presentando un incremento en los niveles de nitritos de forma similar a los presentados por el grupo de ejercicio a pesar de presentar niveles de oxígeno de 0.3 mg/L y 5.7 mg/L respectivamente (Tabla V, Anexo). La concentración promedio de nitritos fue muy similar para los tratamientos de hipoxia (2.42 $\mu\text{M/L}$) y de normoxia (2.37 $\mu\text{M/L}$), ambos con condiciones de oxígeno muy diferentes (Fig. 26).

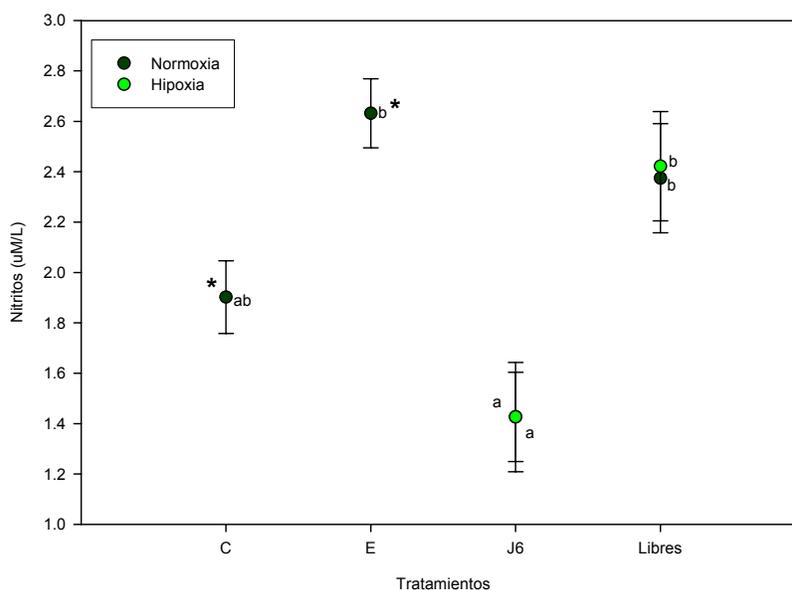


Fig. 26. Concentración de nitritos en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J6 y libres indican en normoxia niveles de oxígeno de > 5 mg/L y en el caso de hipoxia niveles de < 0.5 . En los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$). En los casos en que los datos de los tratamientos fueron diferentes significativamente (t de student, $p < 0.05$) se indica con un asterisco.

7.4.7.1 Nitratos en Hemolinfa ($\mu\text{M/L}$).

La concentración de nitratos en hemolinfa presentó diferencias estadísticas significativas ($F_{(15,73)}=4.4991$, $p=0.001$), aunque no por efecto del nivel de oxígeno ya que los tratamientos de normoxia e hipoxia se comportaron de forma muy similar en condiciones de oxígeno diferentes (Fig. 27). La concentración de nitratos no presentó diferencias estadísticas entre el grupo control ($0.27 \mu\text{M/L}$) y el grupo de ejercicio ($0.28 \mu\text{M/L}$, $p= 1.0$) (Tabla VI, Anexo).

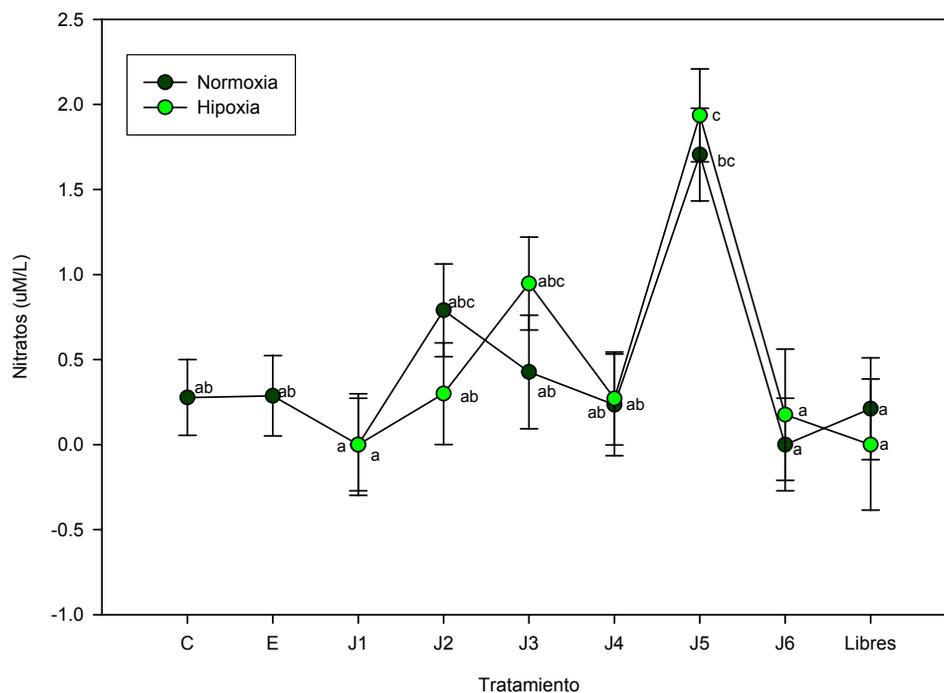


Fig. 27. Concentración de nitratos ($\mu\text{M/L}$) en el grupo control (C), en el grupo ejercicio (E) y en los tratamientos de Normoxia e Hipoxia. Las jaulas J1, J2, J3, J4, J5, J6 y libres indican en Normoxia niveles de oxígeno $> 5 \text{ mg/L}$ y en el caso de Hipoxia de 3.72, 2.97, 1.93, 0.93, 0.45 y 0.32 respectivamente, en los organismos libres en hipoxia el nivel de oxígeno fue de 0.3 mg/L. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p<0.05$).

La concentración de nitratos se incrementó en los organismos de la J2 del grupo de normoxia ($0.78\pm 0.27 \mu\text{M/L}$) y en los de la J3 ($0.9461\pm 0.29 \mu\text{M/L}$) del tratamiento de hipoxia con respecto al los grupos C y E, para volver a disminuir en ambos tratamientos en

la J4. A pesar de esto, en los organismos de la J5 de ambos tratamientos (normoxia e hipoxia), los niveles de nitratos en hemolinfa se dispararon de forma significativa (Fig.27) alcanzando los valores más elevados registrados en todo el experimento (1.70 $\mu\text{M/L}$ para normoxia y 1.93 $\mu\text{M/L}$ en el caso de hipoxia). Una vez alcanzado este nivel, en los organismos de la J6 y en los libres de ambos tratamientos, los nitratos disminuyeron a niveles cercanos a cero (Tabla VI, Anexo), sin importar el nivel de oxígeno ya que en normoxia este fue de 5.63 mg/L y en hipoxia de 0.45 mg/L.

8. Discusión.

8.1 Diseño experimental, ejercicio e hipoxia.

El evento de hipoxia ambiental se presenta de forma recurrente en los sistemas de cultivo (Fig. 5, Anexo). Estos eventos se encuentran asociados a la temperatura del agua (Fig. 4 y 5, Anexo), donde las condiciones de hipoxia más graves ($> 2 \text{ mg O}_2/\text{L}$) se presentan cuando la temperatura se encuentra alrededor de los 30°C . Debido a que en condiciones de temperatura elevada se reduce la solubilidad del oxígeno en el agua (Boyd, 1990). Esta condición de déficit en el nivel de oxígeno dentro de los sistemas de cultivo dura pocas horas (hipoxia aguda). Durante el diseño experimental del presente trabajo se trató de simular estas condiciones que se generan natural y recurrentemente en los sistemas de cultivo; realizando el experimento a 30°C y bajo hipoxia aguda (7 h).

Es importante mencionar que Mikulski *et al.* (2000) reportan la importancia del considerar la concentración del CO_2 cuando se realizan estudios sobre la hipoxia y el sistema inmune, ya que otros trabajos parecidos al realizado como el de Le Moullac, *et al.*, (1998) y otros no consideran el pH y la concentración de CO_2 a lo largo de todo el experimento. Por lo que en estos trabajos permanece la incertidumbre de si los organismos fueron sometidos a hipoxia hipercápnica o normocápnica. Sin embargo, en este trabajo el pH fue monitoreado a lo largo de todo el experimento, en condiciones de hipoxia normocápnica el pH registrado por Mikulski *et al.* (2000) fue de (7.8-8.1) y en hipoxia hipercápnica de (6.8-7.0). Esta reducción en el pH se debe a un incremento en la concentración de CO_2 ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$; $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$) que al disolverse en el agua de mar reduce el pH (Boyd, 1990). En nuestro trabajo el pH se mantuvo similar en los todos los tanques, teniendo un pH entre 7.3 y 8.0, asegurando de esta forma que las condiciones de hipoxia en este experimento fueron normocápnicas.

Otro factor que se tomó en consideración para el diseño experimental fue el ejercicio de los organismos (actividad muscular por movimiento) previo a la exposición a

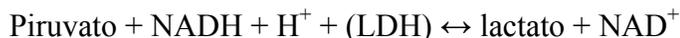
la hipoxia. Este factor fue considerado debido a que cuando existe un evento de hipoxia en los estanques de cultivo, los camarones migran activamente para buscar zonas ricas en oxígeno, provocando que los organismos realicen ejercicio durante este evento. Wu, *et al.*, (2002) reportaron que *Metapenaeus ensis* responde ante un evento de hipoxia modificando su conducta, ya sea incrementando el nado ó incluso movilizándose bruscamente cuando el oxígeno disminuye de 2 mg O₂/L, tratando de encontrar condiciones ricas en oxígeno. Esta habilidad para detectar y evitar los niveles bajos de oxígeno se ha reportado para *Crangon crangon*, *Penaeus japonicus*, *Macrobrachium nipponense* (Wu *et al.*, 2002), *Leiostomus xanthurus*, *Lagodon rhomboides*, *Micropogonias undulatus*, *Brevoortia tyrannus*, *Mugil curema*, *Fundulus heteroclitus*, así como el camarón café *Penaeus aztecus* los cuales se movilizan activamente a zonas ricas en oxígeno (4 mg O₂/L), evitando zonas hipóxicas (1 mg O₂/L) (Wannamaker y Rice, 2000).

Eby y Crowder, (2002) reportaron que *Callinectes sapidus*, *Penaeus sp.*, *Bairdiella chysoura*, *Paralichthys lethostigma*, *Trinectes maculatus* y *Cynoscion regalis*, evitan regiones con hipóxicas (< 2.0 mg O₂/L) ajustando su distribución espacial para encontrar zonas normóxicas. Debido a este comportamiento no es difícil pensar que cuando las condiciones de oxígeno disuelto en los cultivos son bajas, los organismos se movilen activamente (nado) para buscar zonas ricas en oxígeno.

Por otro lado ante un evento de hipoxia, los acuicultores resuelven el problema en los estanques de cultivo, mediante recambios de agua o con el uso de “jets-skies” para incrementar la oxigenación en el estanque. Esto genera corrientes dentro del estanque que favorecen la movilización y el estrés de los organismos durante el evento de hipoxia (Guillermo Portillo comunicación personal.). Aunque se sabe que el uso de aireadores previene el estrés y la mortalidad cuando existe hipoxia dentro del tanque (Boyd, 1998), solo el 2% de las granjas dedicadas a la acuicultura del camarón en el noroeste de México utilizan aereación (Páez-Osuna *et al.*, 2003), esto complica la situación de los organismos ante un evento de hipoxia, ya que se sabe que durante el ejercicio (nado de los organismos)

las reservas energéticas son utilizadas, reduciendo la cantidad de energía para enfrentar este evento.

Durante el ejercicio la fuente inmediata de energía para la contracción muscular proviene de la hidrólisis del ATP. Ya que el ATP existe en concentraciones muy bajas en el músculo, y los mecanismos reguladores parecen prevenir su degradación completa, los organismos han evolucionado en una serie de rutas bioquímicas para regenerar el ATP. Existen tres procesos integrados que operan juntos para satisfacer los requerimientos de energía del músculo durante el ejercicio. El primer proceso implica la ruptura de fosfágenos de alta energía, los cuales junto con el ATP almacenado en las células proveen de energía al organismo en las etapas iniciales del ejercicio intenso o explosivo. El segundo proceso involucra el catabolismo anaeróbico de los carbohidratos, principalmente en forma de glicógeno muscular a ácido pirúvico producto de la glicólisis y finalmente ácido láctico (una vez que el piruvato es producido, puede ser transportado a la mitocondria y ser oxidado vía la piruvato deshidrogenada o reducido a lactato en el citosol vía la LDH) (Gastin, 2001).



El tercer proceso, es el metabolismo oxidativo o aeróbico, el cual involucra la combustión de α -oxoácidos provenientes de las proteínas y carbohidratos en presencia de oxígeno. La ruptura de los fosfágenos almacenados, ATP y la ruptura anaeróbica de carbohidratos comprenden el sistema de energía aeróbico, el término aláctico (ácido láctico no formado) y láctico es usualmente usado para describir estas rutas anaeróbicas (sin oxígeno), por lo que el metabolismo anaeróbico puede ser dividido en dos, el ATP-fosfágenos ó aláctico y el glicolítico o láctico (Gastin, 2001). Ambas rutas son capaces de regenerar ATP, pero no pueden ser mantenidas por mucho tiempo a diferencia del sistema de energía aeróbico.

En los camarones peneidos los lípidos y los carbohidratos (CHO) tienen poca participación en el metabolismo sin embargo, se sabe que las proteínas y los aminoácidos son la mayor fuente de energía (Rosas *et al.*, 2000, Rosas *et al.*, 2002). Dall y Smith (1968) reportaron que los aminoácidos son los que contribuyen con la mayor parte de la energía metabólica. Dentro de los compuestos nitrogenados que contribuyen de forma directa a la energía metabólica durante la actividad muscular como lo es el ejercicio, están los fosfágenos. En los vertebrados el principal fosfágeno es la fosfocreatina (FCr) no obstante, existe un gran grupo de otros compuestos fosforilados que han sido identificados en los invertebrados, los cuales se ha demostrado que juegan un papel similar o idéntico a la FCr. El término *fosfágeno* es usado para definir a todos los compuestos guanidino fosforilados que sirven para regenerar el ATP (Wyss y Kaddurah-Daouk, 2000).

En el caso de los camarones peneidos se ha demostrado la presencia de la arginina-cinasa (AK) la cual es una fosfágeno-ATP fosfo-transferasa encontrada en los invertebrados, esta tiene una función análoga a la creatina cinasa encontrada en los vertebrados. En *Peneaeus aztecus* se ha encontrado grandes cantidades de AK, así como en *Callinectes sapidus*, *Limulus polyphemus*, *Homarus vulgurus* (France *et al.*, 1997). Suzuki y Furukohri, (1994) reportan la secuencia de cDNA de la arginina cinasa (AK) en *Nordotis Masaka* (abulón) y *Peneaeus japonicus*. Ésta se ha comprobado que se expresa en *Carcinus maenas* y *Callinectes sapidus* (Kotlyar *et al.*, 2000). Recientemente se ha observado que en ciertas especies que son sometidas a altos niveles de ejercicio como el calamar *Lolliguncula brevis*, los niveles de fosfo-L-arginina se reducen cuando el organismo incrementa su velocidad de nado (Pörtner, 2002). En el calamar *Illex illecebrosus* y en *Loligo pealei* se ha observado que cuando son sometidos a ejercicio, la cantidad de fosfo-arginina se ve reducida, con un incremento en la cantidad de L-arginina en comparación con el control (organismos en reposo) (Pörtner *et al.*, 1993).

Debido a lo anterior, se consideró importante que el diseño experimental incluyera el ejercicio previo a la hipoxia, para asegurar que todas las posibles reservas de ATP y fosfágenos fueran utilizadas para inducir la ácidolactosis durante este proceso.

8.2 Consumo de oxígeno y comportamiento de los organismos.

Se ha reportado que los crustáceos son oxígenoconformadores, actualmente se sabe que la mayoría de éstos tienen capacidad de regular el consumo de oxígeno ante un evento de hipoxia (McMahon, 2001^a). Esta respuesta implica una reducción en el ritmo respiratorio y cardíaco (bradicardia), un incremento en el flujo branquial y hemolinfático (McMahon, 2001^a), así como el desarrollo de un incremento en la afinidad de la hemocianina por el oxígeno a causa de un incremento en el ácido láctico y urato, ambos productos del metabolismo anaeróbico (Lallier y Truchot, 1989, McMahon, 2001^a).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *L. vannamei* presenta cierta capacidad oxígeno para regular oxígeno en ambientes hipóxicos, ya que cuando los organismos fueron sometidos a un niveles de oxígeno de 2.45 mgO₂/L a 0.3 mg/L (Fig. 2), éstos mantuvieron un consumo de oxígeno de aproximadamente 0.2 mg O₂/g/h. No obstante, por arriba de este nivel (2.45 mg O₂/L), los organismos disminuyeron el consumo de oxígeno de forma gradual indicando un cambio en la tasa metabólica (Fig. 2). Se sabe que los camarones ante la baja disponibilidad de oxígeno por un evento de hipoxia, presentan un ajuste metabólico, el cual implica una disminución en el consumo de oxígeno y en paro del metabolismo aeróbico, como se observó en este trabajo y como se ha demostrado en los trabajos de Racotta *et al.*, (2002) para *L. vannamei*, de Morán (2003) para *F. californiensis* y Rosas *et al.*, (1999) para *L. setiferus*. En este último trabajo se demostró que los camarones peneidos son particularmente sensibles a las bajas condiciones de oxígeno, y que el consumo de oxígeno en esta especie disminuye cuando el nivel de oxígeno se encuentra entre 4 mg/L y 2 mg/L, lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo para *L. vannamei*. Este respuesta del consumo de oxígeno ante un evento de hipoxia también está reportado para otras especies como *Callinectes sapidus*, *Hemigrapsus nudus*, *Libinia emarginata*, *Panopeus herbsti*, *Limulus polyphemus* (DeFur y Magnum, 1978), *Eriocheir sinensis* (Zou *et al.*, 1996), *Corystes cassivelaunus* y *Galathea strigosa* (Bridges y Brand, 1890), así como *Procambarus clarkii* y *Homarus americanus*, donde además de

una reducción en el consumo de oxígeno se presenta una disminución en el ritmo cardiaco y en el flujo de la hemolinfa a través las arterias (Reiber y McMahon, 1998).

Además de la reducción en el consumo de oxígeno de *L. vannamei* observado en este trabajo, se encontró que la hipoxia modificó el comportamiento de los organismos. Cuando el nivel de oxígeno fue menor a 1 mg/L los organismos disminuyeron su grado de actividad. Estos resultados coinciden con lo reportado para *L. vannamei* en el trabajo de Pérez-Rostro *et al.*, (2004) donde se observó que dicha especie, muestra poco movimiento y nado errático cuando el nivel de oxígeno es de 0.4 mg/L. Esta respuesta también ha sido observada en otras especies como *Panulirus interruptus* bajo condiciones de hipoxia (Ocampo *et al.*, 2003) y *Metapenaeus ensis* el cual ante una disminución en el nivel de oxígeno en el agua (por debajo de 2 mg/L) reduce el consumo de oxígeno, el ritmo cardiaco y se vuelve inactivo como una estrategia para reducir el costo energético durante un evento de hipoxia (Wu *et al.*, 2002). Este tipo de comportamiento ante el estrés por hipoxia es importante para el manejo de los camarones cuando se encuentran bajo estas condiciones, ya que la reducción en la actividad que *L. vannamei* presentó indica una reducción en el metabolismo como una estrategia para sobrevivir a la hipoxia, por lo que no es recomendable movilizar o estresar a los organismos bajo estas condiciones.

8.3 Variables fisicoquímicas.

Se sabe que los organismos acuáticos, incluyendo los invertebrados, excretan amonio como principal producto del metabolismo del nitrógeno (Wright, 1995). En los crustáceos decápodos, el nitrógeno es excretado como amonio (60-70 % del total del nitrógeno), aminoácidos (10%) y pequeñas cantidades de urea y ácido úrico (Lee y Chen, 2003). A pesar de esto, se ha demostrado que ciertos invertebrados marinos presentan niveles altos de actividad de arginasa, acoplados con una baja actividad de ureasa, lo cual permite un patrón ureotélico de excreción en estos organismos. Hanlon (1975) reportó esta condición en crustáceos decápodos como *Carcinus maenas*, *Cancer irroratus*, *Cancer boreales*, *Libinia emarginata*, *Eupagurus pollicaris*, los cuales presentan una alta capacidad para

excretar urea. Lallier y Walsh (1991) han reportado en *C. sapidus* y *Menippe mercenaria* la actividad de enzimas como uricasa y xantina hidrogenasa, las cuales permiten la producción de ácido úrico y urea. Por otro lado Sharma y Neveu (1971) detectaron en *O. rusticus* actividad de enzimas que catalizan la conversión de ácido úrico a urea por la ruta uricolítica. Este trabajo realizado con *L. vannamei* parece indicar que el nitrógeno excretado por esta especie puede ser en forma de urea, debido a que en el tanque CA donde no hubo organismos no se registro la presencia de urea a diferencia de los tanques (N y H), sin embargo, hacen falta estudios que demuestren en esta especie la ruta de biosíntesis de la urea.

En este trabajo se observó que durante el experimento la concentración de urea, amonio total, nitratos y nitritos incrementó en *L. vannamei* en condiciones de ejercicio en comparación con el grupo control. Este cambio se atribuye a una modificación en el metabolismo y excreción del nitrógeno por parte de los organismos. Existen trabajos que reportan que camarones como *M. japonicus*, ante un cambio ambiental o un estresor, incrementan la excreción de amonio y urea, donde la excreción de amonio es reflejo del catabolismo de los aminoácidos, así como la degradación de purinas y pirimidinas (Lee y Cheng, 2004). Dado lo anterior, cabe la posibilidad de que al incrementarse la demanda energética durante el ejercicio, el metabolismo del nitrógeno haya sido modificado, reflejándose en un incremento en el nitrógeno excretado como amonio, urea, NO_2 y NO_3 en *L. vannamei*.

Además del ejercicio, la hipoxia modificó la producción de amonio total ($\text{NH}_3\text{-N} + \text{NH}_4\text{-N}$) y urea, incrementándose la excreción de urea y disminuyendo la excreción de amonio. Este efecto ya ha sido reportado para *Carcinus maenas* (Regnault y Aldrich, 1988) y *M. japonicus*, este último cuando es sometido a un cambio de salinidad modifica la excreción nitrogenada, con un incremento en la excreción de urea y ácido úrico y un decremento en la excreción de amonio y nitritos (Lee y Chen, 2003). Lo que indica que en dicha especie se presenta ureogénesis y uricogénesis.

Pillai y Diwan, (2002) han reportado que *Metapenaeus monocerus* modifica la excreción de amonio cuando hay un incremento en la salinidad, reduciendo la excreción de éste. Cheng y Chen (2001) reportan que *P. japonicus* incrementa la cantidad de urea y reduce la concentración de amonio en la hemolinfa, cuando existe un incremento en los nitritos del agua. Teniendo que la contribución total del amonio a la excreción total de nitrógeno disminuye de 10 a 3.8% cuando se incrementa la concentración de nitritos y la urea se incrementa un 58 a 21.4% (Cheng y Chen, 2001).

Se sabe que en *Pandalus platyceros* la excreción de urea y amonio está relacionada con la temperatura y con la salinidad (Quarmby, 1985). Así mismo en *Carcinus maenas* se ha demostrado que un incremento en la salinidad y descenso en la temperatura disminuyen la cantidad de amonio e inducen un aumento en la urea presente en la hemolinfa (Spaargaren, 1982). Por otro lado, se ha demostrado que *Macrobrachium rosenbergii* modifica la excreción nitrogenada por efecto del pH en el agua, teniendo que la excreción de amonio y de nitrógeno total, disminuye conforme se incrementa el pH del agua, mientras que la excreción de urea, nitritos y nitratos se incrementa conforme el pH del agua aumenta (Chen y Kou, 1996^a). Este efecto también se ha observado por un cambio en la temperatura, donde un incremento en la temperatura incrementa la excreción de urea, mientras que la excreción de amonio disminuye (Cheng y Kou, 1996^b). Finalmente en *P. chinensis* se ha observado que la excreción de urea y nitritos se incrementa con la salinidad, pH y la cantidad de amonio en el agua, mientras que la excreción de amonio disminuye con un incremento en la salinidad, pH y amonia ambiental (Chen y Lin, 1995).

El decremento observado en la cantidad de amonio en el agua y el incremento en la concentración de urea cuando el nivel de oxígeno estuvo por debajo de 1 mg/L, puede ser entendido como un reflejo de un cambio en el metabolismo del nitrógeno en *L. vannamei*. Este resultado coincide con lo reportado por Calderón (2004) para esta misma especie, quien reporta que en *L. vannamei* la excreción de amonio disminuye en condiciones hipóxicas cuando el oxígeno es menor a 2 mg/L sin embargo, en este trabajo no se reportó

la excreción de urea. No obstante, este autor observó que bajo condiciones de pH alcalino (pH 10 en presencia de amonio) la excreción de urea se incrementa, con una reducción en la excreción de amonio. Existen reportes en *Carcinus pagurus* donde se ha demostrado que los organismos reducen en un 50-60% la excreción de amonio ante una reducción en el oxígeno disuelto (Regnault, 1993; En: Rosas *et al.*, 1999).

Debido a que los organismos fueron ayunados durante el experimento no se descarta que además del efecto que presentó la hipoxia en la concentración de amonio excretada por *L. vannamei*, el ayuno pudo haber tenido un efecto durante el experimento. Rosas *et al.*, (1999) reportan que *L. setiferus* disminuye la excreción de amonio (15% de salinidad) cuando hay un decremento en oxígeno disuelto, tanto en organismos alimentados como ayunados. Sin embargo, a 35‰ el amonio disminuye en los organismos no alimentados de forma independiente al nivel de oxígeno, a diferencia de los organismos alimentados donde la excreción de amonio se incrementa bajo dichas condiciones (Rosas *et al.*, 1999). No obstante, en los resultados obtenidos en este trabajo con *L. vannamei* se obtuvieron resultados diferentes en la excreción de amonio entre los organismos sometidos al tratamiento de normoxia e hipoxia bajo las mismas condiciones de alimentación (ayuno), por lo que existe evidencia de que bajo condiciones de hipoxia el metabolismo del nitrógeno es modificado en esta especie. Esto coincide con lo reportado por Regnault y Aldrich (1988), quienes mencionan que *Carcinus maenas* reduce en un 40% la excreción de amonio cuando es expuesto a niveles de oxígeno por debajo de 2.8 mg/L en organismos alimentados y en un 45% en organismos sometidos a 3 días de ayuno, donde esta disminución en la excreción de amonio se debe a un disturbio en el balance ácido-base y/o a un cambio a otras rutas metabólicas en el catabolismo del nitrógeno.

El considerar la concentración de amonio, nitritos y nitratos en el agua utilizada durante el experimento fue importante, ya que altas concentraciones de estos compuestos nitrogenados en el agua pueden afectar a los organismos tanto fisiológicamente como inmunológicamente. Se sabe que un incremento en el amonio del agua puede disminuir la

termotolerancia (Alcaraz *et al.*, 1997) y el consumo de oxígeno (Alcaraz *et al.*, 1999) en larvas de *L. setiferus*, así como reducir el crecimiento y modificar la frecuencia de la muda como se ha observado en *P. japonicus* (Chen y Kow, 1992). Cavalli, *et al.*, (1998) reportan que una concentración mayor a 6.86 mg/L de amonio afecta el crecimiento y la supervivencia de *P. paulensis*. Chen y Lei, (1990) mencionan que la L₅₀ de *P. monodon* por amonio y nitritos es de 94.96 mg/L y 215.85 mg/L respectivamente. Chen y Lin, (1991) reportan que para *P. penicillatus* la L₅₀ es de 59.49 mg/L de amonio, con un período de exposición de 24 h. En *P. chinensis* la L₅₀ reportada es de 66.73 mg/L de amonio (Chen y Lin, 1992) y para *L. vannamei* la L₅₀ es de 68 mg/L (Lin y Chen, 2001). Al parecer el amonio (NH₄⁺) afecta el flujo de sodio y provoca una modificación en el pH sanguíneo afectando las reacciones catalizadas por enzimas, la estabilidad de la membrana celular (Campbell, 1973: En Chen y Kow, 1993), y la osmoregulación (Colt y Armstrong, 1981). Racotta y Hernández-Herrera (2000) mencionan que un incremento en la concentración de amonio (2.14 mM/L) a 39 ‰ afecta el consumo de oxígeno, los niveles de lactato y glicógeno en el hepatopáncreas, reduciendo la concentración de oxihemocianina, acilglicerol y colesterol.

Adicionalmente al efecto fisiológico que se induce en los organismos, se ha reconocido que el incremento de amonio afecta la función inmune. En *Marcrobrachium rosenbergii* se sabe que una concentración de amonio de 3.18 mg/L en el agua puede afectar la respuesta inmune de esta especie, afectando la supervivencia cuando es retado a *Enterococcus* (Cheng y Chen, 2002). Existen trabajos en *L. vannamei* donde se reporta que cuando la concentración de amonio en el agua es mayor o igual a 5.24 mg/L la supervivencia de *L. vannamei* se ve afectada cuando es infectado por *Vibrio alginolyticus* (Liu y Chen, 2004). No obstante, la concentración de amonio en el agua durante el presente experimento se mantuvo en niveles por debajo de los reportados por estos autores, a 0.0168 mg de amonio/L.

Sabe que los nitritos, a pesar de que son un componente natural en el ciclo del nitrógeno, pueden causar toxicidad. Los camarones tienen la capacidad de acumular nitritos en la hemolinfa cuando la concentración de nitritos se incrementa en el agua de mar, afectando el flujo branquial del ion Cl^- , el balance de K^+ y Na^+ y la regulación hormonal (Jensen, 2003). Los nitritos tienen la capacidad de acumularse en la hemolinfa cuando los niveles de estos en el agua son superiores a los $1.43 \mu\text{M/L}$ (Chen y Chen, 1992) y 0.72 mM (Cheng y Chen, 2000^a), como se ha reportado para *P. japonicus*. En *P. monodon* que los nitratos se acumulan en la hemolinfa cuando los niveles son superiores a 0.774 mM (Cheng *et al.* 2002^b). Sin embargo los nitratos en el control de agua alcanzaron los $0.0132 \mu\text{M/L}$, por lo que se descarta un posible efecto en los niveles de nitratos registrados en hemolinfa.

Existen reportes que mencionan que un incremento en los niveles de nitritos en el agua, pueden afectar la inmunidad de *L. vannamei* cuando los niveles de nitritos alcanzan los $5.15\text{-}21.40 \text{ mg/L}$ se incrementa la su susceptibilidad de *L. vannamei* a *V. alginolyticus*, con período de exposición de $48\text{-}168 \text{ h}$ (Tseng y Chen, 2004). La máxima concentración de nitritos en el agua en el presente estudio fue de $1.9330 \mu\text{M/L}$ (0.0541 mg/L), la cual se registro en el grupo de organismos sometidos a ejercicio, y el control de agua presentó una concentración de $0.439 \mu\text{M/L}$ (0.012 mg/L). Por lo que se asume que los cambios observados en los parámetros asociados al sistema inmune durante este experimento fueron modificados de forma independiente al nivel de nitritos en el agua.

8.4 Variables fisiológicas en Hemolinfa de camarón.

La hipoxia induce una condición que favorece un aumento en el metabolismo anaeróbico en los crustáceos, generando la acumulación de metabolitos producto de la glicólisis como el L-lactato (Racotta *et al.*, 2002). La inducción del paro metabólico aeróbico durante la hipoxia fue muy importante en este trabajo para verificar que realmente

se produjo una hipoxia funcional (celular) en *L. vannamei*. Esto permitió valorar el impacto de esta sobre el sistema inmune.

A pesar de que los trabajos realizados en *L. vannamei* se refieren al efecto de la hipoxia sobre la producción de ácido láctico y glucosa, un evento de hipoxia depende de la concentración de oxígeno donde se ubique el intervalo hipóxico, de la especie que se está estudiando y de la respuesta fisiológica. Por lo que es importante considerar que para este trabajo se han definido 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. Bajo condiciones de hipoxia ambiental moderada algunas especies como *Homarus vulgaris* no presenta ningún efecto en el metabolismo, debido a que muchas especies presentan estrategias para mantener su metabolismo aeróbico aun bajo dichas condiciones (Butler *et al.*, 1978).

En este trabajo se pueden definir tres etapas durante la hipoxia con *L. vannamei*. La primera etapa ocurre en niveles de oxígeno por arriba de 3 mg/L, en esta el organismo conserva un alto consumo de oxígeno y el metabolismo aeróbico sigue funcionando con la capacidad de disminuir el lactato producido por el evento de ejercicio. La segunda etapa es una etapa de regulación del organismo y ocurre cuando el nivel de oxígeno disminuye de 3 a 1 mg/L, en la cual los organismos disminuyen su consumo de oxígeno pero los niveles de lactato y glucosa se mantienen similares a los que se presentan en normoxia, adaptando su tasa metabólica para mantener el metabolismo aeróbico, indicando que bajo esta segunda etapa se presenta una disminución en el metabolismo por efecto de la hipoxia ambiental, como lo reporta Wu (2002) en vertebrados.

En la última etapa cuando el nivel de oxígeno se encuentra por debajo de 0.5 mg/L el organismo mantiene un consumo de oxígeno reducido y ocurre un paro metabólico aeróbico el cual implica una reducción en la fosforilación oxidativa, a causa de una

limitación en la disponibilidad del oxígeno, que a también afecta el ciclo de Krebs, favoreciendo la acumulación de productos como el lactato (Laradey y Storey, 2002) y liberando NAD^+ (Mathews y van Holde, 1996). De esta manera cuando el nivel de oxígeno es menor a 0.5 mg/L los organismos sufren una hipoxia funcional o celular, provocada por una disminución en el oxígeno ambiental. Es en esta última etapa donde los organismos se encuentran afectados energéticamente y donde se detecta un déficit de oxígeno a nivel celular. Sin embargo, la respuesta a esta hipoxia funcional o celular fue diferente entre los organismos libres y aquellos que se mantuvieron en reposo, a pesar de estar bajo las mismas condiciones limitantes de oxígeno (0.3-0.2 mg/L). Reflejando que a pesar de haber la misma condición de hipoxia ambiental y de reducción en el metabolismo aeróbico, la condición del movimiento de los organismos durante el proceso de hipoxia agudiza la activación del metabolismo anaeróbico a diferencia de los organismos en reposo, lo cual resulta muy importante y debe considerarse cuando se realizan trabajos sobre el efecto de la hipoxia en el metabolismo de *L. vannamei*.

En esta tercera etapa se demostró que *L. vannamei*, bajo condiciones de oxígeno menores a 0.5 mg/L, presenta una reducción importante en el metabolismo aeróbico reflejado por un evidente incremento en los niveles de ácido láctico como producto del metabolismo anaeróbico. Demostrando que bajo esta condición de oxígeno se presenta una hipoxia funcional (celular) en esta especie, a diferencia de los organismos sometidos a niveles de oxígeno por arriba de 0.5 mg/L, donde no se observa esta respuesta. Obteniendo bajo estas condiciones experimentales los mayores niveles de ácido láctico (<60 mg/dL) reportados para esta especie en hemolinfa. La respuesta es más evidente en los organismos libres, ya que al tener capacidad de movimiento presentaron un mayor trabajo muscular que los organismos enjaulados, incrementándose la demanda energética por el movimiento.

Esta activación del metabolismo anaeróbico bajo condiciones hipóxicas coincide con el trabajo de Racotta *et al.*, (2002) donde se encontró que *L. vannamei*, ante un evento de hipoxia sufre una reducción en el metabolismo aeróbico incrementado la concentración de

lactato. Sin embargo, los niveles de lactato en hemolinfa reportados por estos autores nunca fueron mayores de 30.1 mg/dL cuando los organismos fueron sometidos a hipoxia (1.5 mg O₂/L) durante tres días. Pérez-Rostro *et al.*, (2004) reportan para la misma especie que existe un incremento de ácido láctico en el músculo y en el hepatopáncreas cuando los organismos son expuestos a hipoxia (0.4 mg/L de oxígeno) debido a una activación del metabolismo anaeróbico.

El incremento en el los niveles de ácido láctico como respuesta a un evento de hipoxia ha sido ampliamente estudiado en los crustáceos y se ha reportado para otras especies como *Penaeus californiensis* (Morán, 2003), *Penaeus japonicus* (Lallier y Truchot, 1989), *Panulirus interruptus* (Ocampo *et al.*, 2003), *Potamon warreni* (Van Aardt y Wollmarans, 1987), *Eriocheir sinensis* (Zou *et al.*, 1996), *Niphargus virei* (Hervant *et al.*, 1999), *Corystes cassivelannus*, *Galathea strigosa*, *Nephrops norvegicus*, *Atelecyclus rotundatus*, *Carcinus maenas*, *Homarus gammarus* (Bridges y Brand, 1980) y *Orconectes limosus* (Gäde, 1984).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los niveles de glucosa registrados en hemolinfa (cuando el nivel de oxígeno se encuentra por debajo de 0.5 mg/L) alcanzan los 60 mg/dL con un tiempo de exposición a la hipoxia ambiental de solo 2 horas aproximadamente, este incremento en los niveles de glucosa (hiperglicemia) ya ha sido reportado para *L. vannamei* por Racotta *et al.*, (2002), estos autores reportan que la cantidad de glucosa en la hemolinfa es incrementada en los organismos expuestos a hipoxia con un nivel de oxígeno no menor de 1.5 mg/L y con un tiempo de exposición de tres días, obteniendo un nivel de glucosa de 57.0 mg/dL en hipoxia y de 12.9 mg/dL en normoxia. A diferencia de lo encontrado por estos autores, el incremento de glucosa en este trabajo se alcanzó en dos horas con un nivel de oxígeno de 0.3 mg/L aproximadamente. Esto se debe considerar ya que en los sistemas de cultivo, es difícil pensar que una condición de hipoxia dure más de un día ya que durante los ciclos diurnos se presenta un incremento en el oxígeno disuelto del agua por parte de la fotosíntesis. Este incremento en los niveles de

glucosa ante un evento de hipoxia, también ha sido reportado en otras especies, como *Panulirus interruptus* (Ocampo *et al.*, 2003) y *Eriocheir sinensis* en hemolinfa (Zou *et al.*, 1996) y *Niphargus virei* en todo el organismo (Hervant *et al.*, 1999).

El aumento en la concentración de la glucosa en los organismos expuestos a hipoxia, indica un incremento en los sustratos necesarios para la glucólisis anaeróbica, lo cual implica una movilización de glucosa a partir del glucógeno almacenado en los tejidos para ser llevados a la hemolinfa y de esta manera satisfacer la demanda energética (Racotta *et al.* 2002). En trabajos como el de Pérez-Rostro *et al.*, (2004) se reporta que cuando *L. vannamei* es mantenido en condiciones hipóxicas (0.4 mg/L) existe un decremento en la cantidad total de carbohidratos en el hepatopáncreas debido a la utilización de glucógeno y oligosacáridos, los cuales posiblemente son movilizados del hepatopáncreas para incrementar la disponibilidad del sustrato para el proceso de glucólisis. Sin embargo, en el trabajo de estos autores no se observó una disminución en los carbohidratos del músculo, sugiriendo que la participación del hepatopáncreas para proveer de glúcidos es más importante que la del músculo.

Además de la hipoxia, en este trabajo se observó un cambio en el metabolismo de *L. vannamei* a causa del ejercicio. La respuesta al ejercicio por parte de los invertebrados marinos depende del tipo de vida así como de las condiciones ambientales en las que se encuentran: concentración de oxígeno, CO₂, salinidad y temperatura (Pörtner, 2002). En este trabajo el efecto post-ejercicio observado en los niveles de ácido láctico (jaula 1 tratamiento de hipoxia, Fig. 5 y 6) y glucosa (jaula 1 tratamiento de hipoxia, Fig. 7 y 8), coinciden con los estudios realizados en otros crustáceos marinos como el caso de *Orconectes limosus* (Gäde, 1984). Este autor menciona que existe un efecto por ejercicio en el metabolismo de esta especie, y que el incremento de ácido láctico por ejercicio es más evidente con el ejercicio severo, teniendo que el grado de acumulación de lactato depende del papel que juega la arginina fosfato en la anaerobiosis funcional (hipoxia funcional o celular). En *O. limosus* el almacén de fosfágenos es rápidamente utilizado durante el

trabajo o ejercicio, reduciéndose rápidamente durante el nado (Gäde, 1984). Por su parte Onnen y Zebe (1983) reportan en *Crangon crangon* esta misma respuesta con una reducción en la arginina fosfato durante el ejercicio.

Adamczewska y Morris (1994) mencionan que la locomoción sostenida por los crustáceos es soportada por el metabolismo aerobio cuando hay oxígeno disponible ya que el metabolismo anaerobio implica una deuda de oxígeno que debe ser pagada. Sin embargo cuando los niveles de ejercicio son exhaustivos los niveles de L-lactato en hemolinfa se ven incrementados ante el incremento en la demanda metabólica, indicando una anaerobiosis.

Metabolismo aeróbico: $6\text{O}_2 + \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 38\text{ATP}$

Metabolismo anaeróbico: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{L-Lactato} + 2\text{ATP}$

Este efecto de acumulación de lactato y glucosa post-ejercicio ha sido reportado para otras especies de crustáceos decápodos como *Callinectes sapidus*, *Cardisoma guanhumi* y *Gecarcinus laterales* (Henry *et al.*, 1994). Estos autores mencionan que el lactato producido durante el ejercicio es nuevamente metabolizado a glucógeno (gluconeogénesis) cuando los organismos son nuevamente sometidos a reposo en condiciones normóxicas. Los resultados anteriores también han sido observados en *Necora puber*, donde el nivel de lactato y glucosa se ve incrementado en el músculo cuando éstos son sometidos a un período de ejercicio (Thorpe *et al.*, 1995).

En el trabajo de Adamczewska y Morris (1994) se encontró que el cangrejo *Gecarcoidea natalis* incrementa el consumo de oxígeno, el ritmo cardíaco y los niveles de lactato y glucosa cuando es sometido a un proceso de ejercicio. De la misma manera en las especies *Cherax destructor* y *Homarus gamarus* se ha visto un incremento en la concentración de lactato en hemolinfa después de ser sometidas a 20 y 50 min. de ejercicio (Phillips *et al.*, 1977). En la especie *Crangon crangon*, Onnen y Zebe (1983) encontraron

que posterior a un evento de ejercicio, esta especie acumula grandes cantidades de lactato y glucosa, debido a que durante el proceso de ejercicio, los músculos utilizan una gran cantidad de fosfágenos, aunque éstos se pueden agotar rápidamente. Si éstos son agotados, entonces el organismo entra a una fase de producción de energía vía metabolismo anaeróbico (sistema glicolítico o láctico) caracterizado por la degradación de glicógeno, generando la acumulación de productos como el lactato.

Los ejemplos anteriores pueden permitir entender porque en *L. vannamei* se encontró que el ácido láctico y la glucosa no fueron modificados en el grupo de ejercicio y post-ejercicio bajo condiciones normóxicas (> 5 mg/L). A pesar de ser sometido a una presión de ejercicio *L. vannamei* en condiciones de normoxia tiene la capacidad de mantener el metabolismo aeróbico y/o recurrir al sistema ATP-Fosfágeno (aláctico) para cubrir la demanda energética del músculo durante el ejercicio. Sin embargo, cuando las condiciones de oxígeno se ven reducidas (4 mg/L) y las reservas de fosfágenos son utilizadas durante el proceso de ejercicio entonces el metabolismo aeróbico se ve afectado por una doble presión, la recuperación post-ejercicio y la reducción en la concentración de oxígeno. Presionando a los organismos energéticamente a recurrir al sistema láctico lo que provocó una acumulación en el ácido láctico en los organismos, como se observa en las J1 del tratamiento de hipoxia (>3 mg O₂/L).

Presentándose de esta manera un comportamiento diferencial en los niveles de ácido láctico en hipoxia y en normoxia; aunque los organismos de ambas jaulas fueron sometidos a un tratamiento de ejercicio previo a la exposición, solo la J1 del tratamiento de hipoxia incrementó sus niveles de ácido láctico. Esto demuestra que *L. vannamei* tiene una gran capacidad para mantener su metabolismo aeróbico a pesar de estar sometido a condiciones de ejercicio en condiciones normóxicas, y que solo cuando el nivel de oxígeno se ve reducido entonces existe un incremento en los productos del metabolismo anaeróbico como el L-lactato. No obstante, el incremento en los niveles de glucosa se observó tanto en hipoxia como en normoxia post-ejercicio, este incremento en los niveles de glucosa

posiblemente se deben a una movilización del glucógeno, para responder a la demanda energética generada durante el período de ejercicio.

Cuando los organismos son colocados en reposo en el tratamiento de hipoxia, los niveles de ácido láctico y glucosa se reducen siendo muy similares a los presentados por los organismos en condiciones normóxicas, esto posiblemente se deba a que en condiciones de reposo existe suficiente oxígeno para pagar la deuda de oxígeno generada durante el ejercicio en hipoxia y de esta manera remetabolizar el lactato y almacenar la glucosa. Esto se ha demostrado en las especies *Callinectes sapidus* y *Homarus americanus*, las cuales estas son capaces de mantener un metabolismo aeróbico, incrementando su consumo de oxígeno post-ejercicio (Houlihan *et al.*, 1985). Finalmente a pesar de presentarse un efecto post-ejercicio en *L. vannamei*, la hipoxia funcional solo se presentó cuando los niveles de oxígeno se mantuvieron por debajo de 0.5 mgO₂/L, donde se obtuvieron los niveles de ácido láctico y glucosa más altos, haciéndose más evidente esta respuesta en los organismos libres, los cuales al estar en movimiento incrementaron su demanda energética.

Estos resultados sugieren que los organismos confinados en la J6 del tratamiento de hipoxia (tanque R y RH), así como los libres sometidos a un nivel de oxígeno menor a 0.5 mg/L, presentaron los indicadores fisiológicos que implican una hipoxia celular, lo cual fue un elemento importante para confirmar que los resultados obtenidos en las variables inmunológicas se encuentran asociados a un evento de hipoxia aguda.

8.5 Variables inmunológicas.

L. vannamei presentó una reducción significativa en la actividad de la FO total (Fig.17), la FO (Fig.19) y la actividad de la proFO (Fig.21) comparado con el grupo control, el de ejercicio y con la última jaula del tratamiento de normoxia, cuando el oxígeno se encontró por debajo de 0.5 mg/L y el ácido láctico en sus niveles más altos. Aunque hacen falta más estudios para entender porque se presenta dicha reducción en el sistema proFO en

condiciones de hipoxia, se puede inferir que bajo condiciones de hipoxia funcional (celular) los organismos modifican su metabolismo y se encuentran en estrés energético, por lo que esta condición pudiera ser la causa de la disminución en el sistema proFO.

A pesar de que la actividad de la FO no presentó una reducción significativa hasta que el oxígeno se encontró por debajo de 0.5 mg/L, ésta mantuvo una tendencia de decremento cuando el nivel de oxígeno es reducido de 4 mg/L a 0.3mg/L. La actividad de FO total y la proFO presentó una caída evidente cuando el oxígeno disminuyó por debajo de 0.5 mg/L. La actividad de la proFO relevante ya que la contribución total de la FO a la FO total fue muy pequeña a comparación de la proFO, esto implica que cuando se presenta un reducción en la proFO, no sólo se esta reduciendo la FO activa, si no también las reservas de enzima inactiva, con las que en dado momento el organismo puede defenderse ante la presencia de un patógeno ó cualquier proceso donde la actividad de la FO sea requerida.

Estos resultados concuerdan el trabajo realizado por Cheng *et al.*, (2002)^a donde se evaluó el efecto de la hipoxia en la función inmune de *Macrobranchium rosenbergii* cuando éste es infectado por *Enterococcus*, encontrando una reducción en la supervivencia de los organismos, cuando estos fueron expuestos a un nivel de oxígeno de 1.75mg/L. Estos autores demostraron que la actividad de la fenoloxidasa solo disminuye cuando el oxígeno se encuentra por debajo de 4 mg/L y 1.75 mg/L con una exposición de 24 y 12 h respectivamente. A diferencia de lo reportado por estos autores en el caso de *L. vannamei* la reducción en la actividad de la FO total, FO y proFO solo se presentó cuando el oxígeno se mantuvo por debajo de 0.5 mg/L, observando un efecto directo en la actividad del sistema proFO cuando el organismo presenta una reducción en el metabolismo aeróbico por hipoxia. Por otro lado, el tiempo de exposición a la hipoxia utilizado por Cheng *et al.*, (2002)^a fue mayor al utilizado en este trabajo, además que estos autores no consideraron la actividad de la proFO, lo cuál es u parámetro importante ya que la cantidad de FO inactiva

en los organismos es un reflejo de la capacidad inmune (del sistema proFO) que estos presentan.

A pesar de que en este trabajo con *L. vannamei* y el de Cheng *et al.*, (2002)^a con *Macrobrachium rosenbergii* se demuestra que bajo condiciones de hipoxia se presenta una reducción en la actividad de la FO, en el trabajo de Le Moullac *et al.*, (1998) con *L. stylirostris*, se encontró un incremento en la actividad de la FO cuando los organismos fueron expuestos a 1 mg/L de oxígeno durante 24 h. A pesar del incremento en la FO por estos autores, estos demostraron que bajo estas condiciones se aumenta la susceptibilidad de *P. stylirostris* a *Vibrio alginolyticus*. Cheng *et al.*, (2004) demostraron que la función inmune de *Haliotis diversicolor supertexta* es modificada cuando esta es infectada por *Vibrio parahaemolyticus* bajo condiciones de hipoxia. La cual presenta un incremento en la actividad de la FO y una reducción en la actividad fagocítica cuando organismos son sometidos a 2.05 mg/L de oxígeno después de 24 h. Bajo condiciones hipóxicas la susceptibilidad de *H. diversicolor* a *Vibrio parahaemolyticus* se incrementa causando una reducción en la respuesta inmune en el abulón. Estos resultados muestran que todavía hace falta esclarecer si la reducción ó el incremento en la FO puede ser directamente asociada o no a la susceptibilidad de los organismos a un patógeno determinado, aunque algunos estudios han mostrado que el sistema proFO puede ser utilizado como un marcador ambiental (Le Moullac y Haffner, 2000).

No obstante, otros autores corroboran el efecto que tienen las variables ambientales en la disminución de la actividad de la FO, Sánchez *et al.*, (2001) y Pascual *et al.* (2003) reportan la temperatura y la aclimatación (cambio de condiciones ambientales del medio natural al laboratorio) tiene un impacto en la función inmune de *L. setiferus*, afectando el sistema de la proFO. En *Macrobrachium rosenbergii* un incremento en el pH, la temperatura y una reducción en la salinidad afecta la función inmune de esta especie disminuyendo la actividad de la FO (Cheng y Chen, 2000^a). También se conoce que el estrés por amonio en esta especie disminuye la actividad de la FO y el estallido respiratorio,

reduciendo la resistencia inmune e incrementando la susceptibilidad de esta especie a *Enterococcus* (Cheng y Chen, 2002). En *Farfantepenaeus paulensis* se ha demostrado que el estrés por captura disminuye la actividad de la FO total y específica (Perazzolo *et al.*, 2002). En *L. vannamei* se ha demostrado que el cambio de ciertas variables ambientales modifica la función inmune. Liu y Chen (2004) reportan que *L. vannamei* incrementa su susceptibilidad a *V. alginolyticus* cuando es expuesto a un incremento en la concentración de amonio en el agua, afectándose la respuesta inmune a causa de una reducción en la actividad fagocítica, y una disminución en la actividad de la FO. Tseng y Chen, (2004) han demostrado que una alta concentración de nitritos disminuye la resistencia de *L. vannamei* y la actividad de la FO. Este trabajo con *L. vannamei* coincide con lo reportado Liu y Chen (2004) y Tseng y Chen (2004) para esta especie, comprobando que existe una relación entre los cambios ambientales y el sistema proFO. Esto resalta la importancia que tiene el manejo de los organismos en los sistemas de cultivo para reducir el estrés ambiental por hipoxia ya que el sistema proFO se ve reducido.

Por otro lado en este trabajo se observó que la actividad total de la fenoloxidasa (FO + proFO) y la profenoloxidasa (Fig. 16 y 20) no solo se ven modificadas por la hipoxia, si no también por efecto post-ejercicio. Aunque no existen reportes del efecto de ejercicio sobre el sistema de la proFO en crustáceos, en este trabajo se pudo observar que existe una respuesta post-ejercicio. Sin embargo, esta respuesta es diferente entre los organismos en condiciones hipóxicas y normóxicas. Bajo condiciones normóxicas el efecto post-ejercicio es mas evidente en la actividad de la proFO y FO total ya que ambas variables se ven incrementadas, no obstante, una vez que los organismos entran en reposo la actividad de la proFO y FO total se estabiliza alcanzando los mismos niveles que el grupo control. Sin embargo, esto no ocurre con el tratamiento de hipoxia, en este caso la actividad de la proFO y FO total aunque no presentó un efecto significativo post-ejercicio en normoxia, sí se observa una tendencia de incremento por el ejercicio. Este efecto en por el ejercicio sobre el sistema proFO posiblemente este relacionado con el metabolismo de los organismos, ya

que durante el ejercicio algunas variables metabólicas como glucosa y lactato fueron modificadas durante este proceso.

La actividad inhibitoria de la α 2-macroglobulina (α 2M), fue modificada por efecto de la hipoxia y el ejercicio en estas condiciones experimentales. En general las α 2-macroglobulinas son inhibidores de proteasas (aspárticas, serin, cistein y metal proteasas) endógenas y exógenas (Magor y Magor, 2001) de amplio espectro (Revisado en: Kanost, 1999). Este inhibidor de proteasas ha sido caracterizado para *L. vannamei* (Gollas-Galván *et al.* 2003) pero no existen reportes del efecto del efecto de la hipoxia en la actividad de la α 2M para esta especie.

Le Moullac *et al.*, (1998) reporta que bajo condiciones hipóxicas hay una reducción en la actividad inhibitoria de proteasas en el plasma de *Penaeus stylirostris*. Por lo que al haber una reducción en la actividad antiproteasa que regule la PPAE se presenta un incremento en la actividad de la FO, como un mecanismo compensatorio para reducir el impacto por el estrés de la hipoxia. No obstante estos autores observan un aumento en la actividad de la α 2M bajo condiciones de hipoxia, por lo que no queda claro el tipo de inhibidor que pudiera estar participando en la regulación del sistema de la proFO. No obstante, a pesar de que estos autores encontraron un incremento en la actividad de la α 2M bajo condiciones de hipoxia (1mg/L de oxígeno), en este trabajo para *L. vannamei* los resultados muestran una disminución en la actividad de la α 2M en el tratamiento de hipoxia cuando el nivel de oxígeno es menor a 0.5mg/L, así como en el tratamiento de normoxia. A pesar de esta disminución en la actividad de la α 2M cuando el oxígeno es menor a 0.5 mg/L se observa también una disminución en la actividad de la FO, FO tot y proFO en hipoxia. Una posible explicación a esto es que debido a que la α 2M es una enzima inhibidora de amplio espectro y tiene la capacidad de inhibir proteasas no necesariamente regule la PPAE del sistema proFO. Cabe la posibilidad que la α 2M este actuando en la regulación de otro tipo de proteasas, incluso en proteasas relacionadas al metabolismo. Si se hace un análisis del comportamiento de este inhibidor durante el experimento se puede

observar que la $\alpha 2M$ presentó una reducción por efecto del ejercicio y este efecto se mantuvo en los todos los organismos sometidos al tratamiento de normoxia.

Esta tendencia de reducción pudiera estar asociada con la actividad metabólica de los organismos, ya que durante el ejercicio la excreción nitrogenada (amonio, urea, nitratos y nitritos) producto del catabolismo nitrogenado, se vio modificada, por lo que posiblemente la actividad proteolítica sea incrementada bajo estas condiciones, reduciéndose la actividad inhibitoria de la $\alpha 2M$. No obstante, en el tratamiento de hipoxia no se mantiene esta tendencia, por el contrario, la actividad inhibitoria se ve incrementada en las primeras etapas del dicho tratamiento (3-1 mg/L), este incremento coincide con la fase de disminución de la tasa metabólica en hipoxia (reducción en el consumo de oxígeno y movimiento). Lo que podría indicar que la actividad de esta molécula no necesariamente esta asociada de manera exclusiva con el sistema proFO si no también con la regulación metabólica.

En *L. vannamei* no se encontró una reducción significativa en los CTH cuando estos son sometidos a hipoxia severa (0.32 mg/L) comparado con el grupo control. Sin embargo, cuando el nivel de oxígeno disminuye a 0.32 mg/L se observa una reducción en el CTH (5.522×10^6 cels/mL) de forma significativa con respecto a la mayoría de los organismos (J3, J4, J5 y J6) sometidos a condiciones de normoxia (> 5 mg O_2 /L). Lo que implica un efecto de reducción en el CTH cuando el nivel de oxígeno alcanza los 0.32 mg/L, lo cual coincide con el paro metabólico aeróbico. Por lo que bajo estas condiciones de déficit energético la capacidad inmune podría verse afectada al presentarse un proceso de enfermedad. Actualmente solo existe un reporte del efecto de la hipoxia en los CTH de *L. vannamei* donde Mikulski *et al.*, (2000) reportan que el CTH se ve reducido por efecto de hipoxia hipercápnic, presentando el CTH más bajo cuando el oxígeno disuelto disminuye y el CO_2 se incrementa, registrando un efecto negativo en la supervivencia de *L. vannamei* cuando este es expuesto a *Vibrio parahaemolyticus* bajo estas condiciones. A diferencia del trabajo de Mikulski *et al.*, (2000) en este trabajo la reducción del CTH se registro en

condiciones de hipoxia normocápnicas, además de que estos autores sólo midieron el CTH sin considerar ninguna variable fisiológica e inmune. No obstante, tanto el trabajo de Mikulski *et al.*, (2000) como este demuestran que bajo condiciones de hipoxia existe un efecto de reducción en la cantidad de hemocitos presentes, por que puede presentar un efecto negativo en la respuesta inmune ante la presión de un patógeno.

La reducción en los CTH por efecto de un cambio ambiental ha sido registrada en otras especies. En *L. setiferus* se ha observado una disminución en el CTH ante un incremento en la temperatura (Pascual *et al.*, 2003), para la misma especie Sánchez *et al.*, (2001) reportan un decremento en los CTH por efecto de la aclimatación. En el caso de *Farfantepenaeus paulensis* se ha reportado que una reducción en la salinidad presenta una disminución en el CTH (Perazzolo *et al.*, 2002) y *Haliotis tuberculata* se ha demostrado que el estrés (por manejo) provoca una reducción en los hemocitos (Malham *et al.*, 2003).

En *Haliotis diversicolor supertexta* los CTH se reducen cuando es infectada por *Vibrio parahaemolyticus* y sometida a un evento de hipoxia (Cheng, *et al.*, 2004), en el caso de *Macrobrachium rosenbergii* también se ha observado esta respuesta, cuando el oxígeno disminuye 2 y 1.25 mg/L se presenta una reducción en los CTH (Cheng, *et al.*, 2002^a). En esta especie también se ha reportado que los CTH se reducen cuando hay un incremento en el pH (9.0) o decremento (4.6-5.0), cuando la temperatura se incrementa, y cuando la salinidad se reduce (Cheng y Chen, 2000^b). En *Penaeus stylirostris* se ha demostrado que cuando esta especie es expuesta a condiciones hipóxicas, los CTH se ven reducidos en un 7.6% (Le Moullac, *et al.*, 1998).

En *L. vannamei* se ha demostrado que un incremento en el amonio aumenta la susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus*, sin presentarse una disminución en el número de hemocitos (Liu y Chen, 2004). Por otro lado, niveles elevados de nitritos provocan una reducción en la función inmune de *L. vannamei* a *Vibrio alginolyticus* donde existe una reducción en los CTH (Tseng y Chen., 2004). Esto coincide con lo encontrado en el presente estudio, ya que a pesar de que no se vio una reducción significativa en el CTH

bajo condiciones hipóxicas comparado con el control, si se pudo observar una tendencia de reducción en los CTH cuando el oxígeno es igual a 0.32 mg/L.

Cabe mencionar, que a pesar de que los conteos totales de hemocitos (CTH) han sido utilizados como un indicador del estado inmune en crustáceos y otros invertebrados, donde la respuesta ante una infección implica una reducción en los CTH como se ha observado en *L. vannamei* cuando este es infectado por el virus Taura (Song *et al.*, 2003). La determinación de este parámetro requiere de una identificación compleja y mucha experiencia que al ser medida arbitrariamente puede presentar una alta variación entre los datos (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

Dentro de las especies que se han medido los CTH se encuentran, *P. japonicus* donde los CTH se encuentran alrededor de 1.7×10^7 cel/mL (Henning *et al.*, 1998 en: Song *et al.*, 2003), en *Carcinus maenas* $14-32 \times 10^7$, en *Palaemon elegans* 2.85×10^7 cels/mL, en *Crangon crangon* 2.97×10^7 cels/mL, en *Squilla mantis* 3.32×10^6 cels/mL (Lorenzon *et al.*, 1999). En *P. stylirostris* 1.84×10^7 (Le Moullac, *et al.*, 1998), *P. monodon* $5.9 \times 10^7 \pm 1.7$ cel/ mL (Van de Braak, 2002), *Liocarcinus depurator* $1.8-1.7 \times 10^7$ /mL (Hammond y Smith, 2002), *L. setiferus* 43.4×10^3 cel/mL (Pascual *et al.*, 2003) y 72.5×10^3 cels/mL (Sánchez *et al.*, 2001), *Macrobrachium rosenbergii* 141.24×10^5 cels/mL (Cheng, *et al.*, 2002^a), *Farfantepenaeus paulensis* 45×10^3 cels/mL (Perazzolo *et al.*, 2002) y en *L. vannamei* $1.64 \pm 0.73 \times 10^7$ cels/mL (Song *et al.*, 2003), 1.17×10^7 cels/mL (Liu y Chen, 2004) y $1.96-2.02 \times 10^6$ cels/mL (Tseng y Chen, 2004). Como se puede observar la cantidad de hemocitos reportada puede variar entre especies de crustáceos y dentro de las especies siendo este parámetro fácilmente afectado por sexo, muda, desarrollo, estado reproductivo, nutrición y condiciones ambientales (Cheng *et al.*, 2003^a; Cheng *et al.*, 2002^a; Pascual *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2001).

En este trabajo con *L. vannamei* se encontró que en el grupo control el CTH presentó 7.91×10^6 cels/mL, él cual estuvo relativamente por debajo de lo reportado en esta especie por Song *et al.*, (2003), Liu y Chen, (2004) y Tseng y Chen, (2004). No

obstante, como ya se menciona el CTH puede variar dentro de la misma especie, dependiendo de las condiciones ambientales y experimentales. Sin embargo, en el grupo de ejercicio y en el resto de los organismos sometidos al tratamiento de normoxia los CTH se encontraron entre 10.88×10^6 cels/mL y 10.49 y 15.7×10^6 cels/mL, teniendo que estos valores son similares a los reportados por Liu y Chen, (2004) para esta *L. vannamei*.

En los resultados obtenidos para *L. vannamei* en este trabajo, se observo un incremento en los CTH en el grupo de ejercicio comparado con el control, así como un efecto post-ejercicio en las jaulas 1 de los tratamientos de normoxia e hipoxia, el cual no esta reportado para esta especie. No obstante existen reportes en vertebrados en donde se ha observado que el ejercicio dependiendo de su intensidad y duración tiene un efecto de inducción en la función de los macrófagos, estimulando la fagocitosis, la actividad de reconocimiento, el metabolismo del nitrógeno, la cantidad de especies reactivas de oxígeno, así como la quimiotaxis de los macrófagos de ratas jóvenes (Woods *et al.*, 2000). Por su parte Jussila *et al.* (2001) reportan que en la langosta *Panulirus cygnus* existe un efecto post-ejercicio en los CTH, incrementándose de 4.5×10^6 cels/mL a 6.4×10^6 cels/mL en organismos sometidos a una hora de ejercicio.

Este tipo de respuesta también se ha observado en *Carcinus maenas* donde la cantidad de hemocitos está relacionada con el ciclo de mareas diario, teniendo una mayor cantidad de hemocitos circulantes durante el periodo de marea alta, que es en el período durante el cual esta especie se alimenta durante la noche y donde se encuentra su pico de actividad (Truscott y White, 1990). Debido a estos resultados se puede suponer que *L. vannamei* también presenta un incremento en el número de hemocitos cuando es sometido a ejercicio, pero la respuesta post-ejercicio depende de la cantidad de oxígeno del agua, por lo que es necesario realizar mas estudios para entender el mecanismo que opera bajo estas circunstancias.

Además de los CTH, la lisozima es una enzima que juega un papel muy importante en el sistema inmune tipo innato de los invertebrados, esta es una enzima antibacterial, que hidroliza el enlace β -1,4 de los peptidoglicanos bacterianos (Olsen *et al.* 2003). Esta enzima

ya ha sido caracterizada para *Marsupenaeus japonicus*, la cual participa en la actividad lítica de diversas especies de *Vibrio*, las cuales son agentes infecciosos en los camarones (Hikima *et al.*, 2003) sin embargo, no existen estudios que reporten el efecto que tiene la hipoxia sobre esta variable inmune.

En este trabajo con *L. vannamei* se observó que la actividad de la lisozima disminuyó un 63.27% en los organismos de la última jaula del tratamiento de hipoxia (0.32 mg/L de oxígeno) comparado con el grupo control (<5.0 mg/L de oxígeno). Como ya se mencionó, esta es una enzima importante en el sistema inmune de los invertebrados ya que debido a su actividad lítica protege a los organismos de las bacterias patógenas. Al reducirse la actividad de la lisozima por efecto de la hipoxia (0.32 mg/L de oxígeno) esto pudiera afectar la capacidad del organismo para defenderse inmunológicamente y esto podría incrementar la susceptibilidad del organismo a un agente infeccioso, como se ha observado en los trabajos de Le Moullac *et al.*, (1998), Cheng *et al.*, (2002)^a y Mikulski *et al.* (2000) en *Penaeus stylirostris* y *Macrobrachium rosenbergii* y *L. vannamei* respectivamente.

La (NOS) es una enzima ampliamente estudiada en los vertebrados, y se encuentra distribuida en todo el reino animal (Sengupta *et al.*, 2003). La NOS es considerada como una de las enzimas más complejas, que tiene funciones tanto fisiológicas como patológicas. Existen tres isoformas, la nNOS (NOS I) o neuronal, la eNOS (NOS III) o endotelial y la iNOS (NOS II) o inducible, las primeras dos se consideran constitutivas y son Ca^{+2} -dependientes (Andrew y Mayer, 1999) y la tercera (iNOS) es Ca^{+2} -independiente (Bogdan, 2001) y se encuentra asociada al sistema inmune (Akaike y Maeda, 2000, Bogdan, 2001, Chakravorty y Hensel, 2003, Coleman, 2001, Holán *et al.*, 2001). A pesar de estas diferencias, las tres NOS producen óxido nítrico (NO) el cual es rápidamente oxidado a nitritos y nitratos, de manera que la cantidad de nitritos y nitratos producidos por un organismo es un reflejo de la actividad de esta enzima (Sun *et al.*, 2003).

Existen reportes donde se ha demostrado que la hipoxia incrementa la producción de NO en especies de vertebrados marinos, tales como *Carassius auratus* (Cameron *et al.*, 2003) y *Hemiscyllium ocellatum* (Nilsson y Renshaw, 2004), donde la producción de NO es incrementada en el sistema vascular y en las neuronas como respuesta a la hipoxia. En mamíferos se ha reportado que existe una relación entre la producción de NO y la hipoxia, donde la isoforma involucrada es la eNOS, sugiriendo que el NO formado por las células endoteliales induce un efecto vascular para incrementar el flujo sanguíneo ante un evento de hipoxia (Sansón y Mark, 2003, Yamamoto *et al.*, 2003).

No obstante, no hay reportes que mencionen el efecto de la hipoxia en la producción de nitritos y nitratos en hemolinfa en *L. vannamei*. En este trabajo sin embargo, se pudo observar que los nitratos y nitritos en hemolinfa no son afectados por el nivel de oxígeno del agua. Debido a que se presentó la misma tendencia en los niveles de nitritos y nitratos en hemolinfa en los tratamientos de normoxia e hipoxia, definiendo que bajo las condiciones de este experimento la producción de los nitritos y nitratos como reflejo de la actividad de la óxido nítrico sintetasa al parecer es oxígeno independiente.

A pesar de esto, los nitritos sí son afectados por la actividad muscular que presentan los organismos, observando que existe un efecto a causa del ejercicio y del post-ejercicio en los niveles de nitritos en hemolinfa. Teniendo que la cantidad de nitritos en la hemolinfa bajo estas condiciones experimentales es afectada por el movimiento de los organismos. Un ejemplo de esto es que aunque en los organismos de la J6 y libres las condiciones de oxígeno fueron las mismas (0.3-0.32 mg/L), los organismos libres presentaron niveles de nitritos mayores que en los organismos enjaulados en el caso del tratamiento de hipoxia. Por otro lado, en tratamiento de normoxia aunque los organismos de la J6 y libres se mantuvieron en condiciones de oxígeno arriba de 5 mg/L, los organismos libres presentaron una mayor concentración de nitritos en la hemolinfa. Otro ejemplo, fue la diferencia en los niveles de nitritos entre los organismos control (en reposo) y los organismos sometidos a ejercicio, observándose un incremento significativo en los

organismos que se sometieron a un periodo de ejercicio. En el caso de la jaula 4 en ambos tratamientos se observó un ligero incremento en los nitritos, pero este pudo haber sido causado por el movimiento en las jaulas y en los organismos generado al sacar la segunda jaula de cada tanque.

En ciertos grupos como en mamíferos, se ha demostrado que el ejercicio es un estimulador importante de los niveles de nitritos en plasma sanguíneo, por actividad de la oxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). La cual actúa como un regulador del flujo sanguíneo ya que funciona como vasodilatador ante un evento de ejercicio, donde los niveles de nitratos y nitritos, así como del NO se ven incrementados ante un evento de ejercicio (Maeda *et al.*, 2001, Schofield *et al.*, 2003 y Ueda *et al.*, 2003). Higashi y Yoshizumi (2004) mencionan que en los mamíferos el ejercicio promueve la función endotelial, donde el ejercicio regula y modifica la presión arterial, el metabolismo de los lípidos, la glucosa y los factores neurohormonales. Estos autores mencionan que no es claro el mecanismo mediante el cual se incrementa la función endotelial durante el ejercicio, pero es evidente que el ejercicio aeróbico incrementa la producción de oxido nítrico por la eNOS. Aunque esta enzima ha sido considerada netamente constitutiva, diferentes factores pueden estimular su actividad como la hipoxia, las hormonas, el ejercicio y una elevación en el Ca^{+2} (Andrew y Mayer, 1999). A pesar de que en este trabajo no se pudo definir cual de las tres isoformas de la NOS es la que incremento la producción del NO durante el experimento existen ciertas evidencias que pudieran señalar que la iNOS no parece jugar un papel evidente bajo estas condiciones experimentales.

La primera evidencia es que existen reportes donde se demuestra que en crustáceos decápodos como *Procambarus clarkii* y *Homarus americanus* el flujo de la hemolinfa y el calibre de las arterias se incrementan por la actividad muscular, aumentando el suplemento de hemolinfa a los músculos abdominales para incrementar la demanda metabólica cuando son sometidos dicha actividad. De esta manera, la cantidad de hemolinfa se dirige hacia las extremidades como apéndices, estructuras bucales y músculos, ya que durante la actividad

muscular se requiere un alto grado de reoxigenación (Reiber *et al.*, 1997, Reiber y McMahon, 1998). En el caso de *Cancer magister* se ha demostrado que cuando esta especie es expuesta a un proceso de ejercicio se incrementa el “output” cardíaco y el flujo de la hemolinfa, la cual es redirigida principalmente a los músculos y escafnatitos, esta redirección de la hemolinfa al parecer es resultado de un control hormonal/neurohormonal en las válvulas cardioarteriales (Wachter y McMahon, 1996). Este hecho aunado a que los crustáceos presentan un sistema vascular donde participa el tejido endotelial (Wilkens *et al.*, 1997) y la distribución de la hemolinfa se lleva a cabo por canales específicos y no aleatorios como se pensaba (McLaughlin, 1983, McMahon, 2001^b). Se asume que bajo condiciones de actividad física la NOS endotelial que trabaja a nivel cardiovascular, incrementa la cantidad de NO producido y esto se ve reflejado en la producción de nitritos en este experimento con *L. vannamei*.

Otra evidencia es que en el caso del sistema cardíaco de *Homarus americanus* se ha demostrado que una NOS calcio dependiente se expresa de forma importante en el músculo cardíaco. Donde la presencia en el músculo cardíaco de esta enzima calcio dependiente provee un mecanismo por el cual la producción local del NO participa en el desempeño del corazón, ya que durante la estimulación (neuronal u hormonal) que incrementa el ritmo cardíaco (actividad física), se incrementa la cantidad de iones Ca^{+2} provocando que la NOS calcio dependiente incremente la producción del NO para inhibir al ganglio cardíaco y contrarrestar el efecto del estímulo excitatorio (Mahadevan *et al.*, 2004). Demostrando que bajo condiciones que permiten el incremento del ritmo cardíaco, la actividad de la NOS calcio dependiente juega un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular. La regulación del sistema cardiovascular durante el ejercicio es un proceso complejo donde se hallan implicados mecanismos de control nerviosos y neuronales (Randall *et al.*, 1998), por lo que hacen falta estudios a cerca de cómo el ejercicio afecta al sistema cardiovascular en *L.vannamei* y cual es el papel de la NOS durante este proceso, aunque los resultados parecen indicar que una NOS calcio dependiente esta participando durante este proceso.

A diferencia de la eNOS y la nNOS, la iNOS cuando incrementa su actividad presenta una fase de retardo de varias horas entre la activación celular y la producción del NO, reflejándose en el tiempo que se toma la síntesis de mRNA y de la proteína, en contraste con las nNOS y la eNOS. Por otro lado la iNOS genera altas concentraciones de NO y este nivel es sostenido por horas o por días, dependiendo de cuánto tiempo la enzima está presente en la célula o el tejido (Coleman, 2001), sin embargo los cambios observados en los niveles de nitritos y nitratos durante el presente estudio mostraron cambios en los niveles de nitritos y nitratos a corto plazo. Otro aspecto importante es que la concentración máxima de nitritos producidos durante todo el experimento no rebasa los 2.63 $\mu\text{M/L}$ y en el caso de los nitratos 1.93 $\mu\text{M/L}$. A diferencia de lo reportado en el trabajo de Nappi *et al.* (2000) sobre *Drosophila melanogaster* y *D. teissieri* donde se encontró que cuando esta era infectada por el parásito *L. bouvardi* la producción de nitritos era de 10-11 μM /muestra de hemolinfa. Por su parte en *Exstigmene acraea* Weiske y Wiesner (1999) demostraron que cuando este lepidóptero es estimulado por la presencia de patógenos y lipopolisacáridos los nitritos se incrementan en 3.5 $\text{nmol}/10^8$ células de *E. acraea*.

En el caso de *Mytilus galloprovincialis* cuando los hemocitos son activados con lipopolisacáridos y beta glucanos, los niveles de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ se incrementan hasta alcanzar niveles de 8 $\mu\text{M/L}$ (Arumugam *et al.* 2000). Por su parte Gourdon *et al.* (2001) demostraron para la misma especie, que cuando los hemocitos son estimulados por agentes extraños estos incrementan la cantidad de nitritos y nitratos de 0.7 μM a 8.0 μM . Tafalla *et al.*, (2003) reportan que cuando los hemocitos de *Ruditapes decussatus* son activados por zymosan, éstos incrementan la cantidad de nitritos de 4 μM a 8-9 μM . Por todo lo anterior, al parecer estos datos corroboran el hecho de que alguna de las NOS calcio dependiente es la que participa, ya que los niveles de nitritos y nitratos encontrados en el presente estudio se encuentran por debajo de lo reportado por estos autores. De asumir que una NOS calcio dependiente es la que está siendo activada bajo estas condiciones experimentales, entonces la actividad inmune realizada por la iNOS no se ve afectada ante un evento de hipoxia y ejercicio, siempre y cuando éstos no sean sometidos a la presión de un patógeno.

Por otro lado, se sabe que el ejercicio incrementa la actividad muscular, incrementándose el flujo de calcio en las células del músculo. El Ca^{+2} juega un papel muy importante en la contracción muscular, donde la troponina y la tropomiosina (asociadas a los filamentos de actina) juegan un papel importante en el efecto del Ca^{+2} durante la contracción. Teniendo que la presencia de calcio y ATP es esencial para el ciclo normal de contracción y relajación muscular (Alberts *et al.*, 2002, Melzer *et al.*, 1995, Randall *et al.*, 1998). La importancia del calcio en la contracción muscular en los invertebrados también ha sido demostrada para *Locusta migratoria* (Dunbar y Huddart, 1982, Wilcox y Lange, 1995), *Lethocerus indicus* (Taylor *et al.*, 1999) y *Procambarus clarkii* (Sakurai *et al.*, 1996) entre otros. Donde la contracción del músculo esta controlada por cambios intracelulares en la concentración de Ca^{+2} . Sin embargo, en los mamíferos se sabe que el ejercicio produce un incremento en la concentración de calcio libre, calcio total y lactato en el plasma (Renoe *et al.* 1980). Foster *et al.* (1989) reportan que *Leptograpsus variegatus* incrementa los niveles de lactato, glucosa y Ca^{+2} en la hemolinfa por efecto post-ejercicio.

Respecto a los nitratos aunque su comportamiento bajo estas condiciones experimentales se mostró de forma independiente al nivel de oxígeno en el agua, no se presentó un comportamiento similar al de los nitritos. Esto pudo haber sido causado por el retardo que existe entre la oxidación de los nitritos a nitratos, pudiéndose observar que en los organismos de la J4 el incremento en los nitritos se vió reflejada en el incremento en los nitratos de los organismos de la J5. Sin embargo, a pesar de esto los niveles de los nitratos se mantuvieron muy bajos, con valores cercanos a cero en algunos casos y sin presentar una relación clara con los nitritos. Sugiriendo que hacen falta más estudios para poder entender la dinámica y la relación que existe entre los factores ambientales y la actividad cardiovascular y muscular con los niveles de nitritos y nitratos en la hemolinfa.

Dado todo lo anterior, este trabajo demuestra que la hipoxia cuando el nivel de oxígeno se encuentra por debajo de 0.5 mg/L afecta de forma importante el sistema proFO, el CTH, la actividad de la lisozima y la actividad reguladora de la $\alpha 2\text{M}$ cuando los

organismos presentan una reducción en el metabolismo aeróbico reflejado en el incremento de el ácido láctico en la hemolinfa en *L. vannamei*. Esto debe considerarse durante el manejo de los organismos en cultivo, ya que la reducción de estos componentes de la función inmune a causa de la hipoxia, puede reducir la resistencia de esta especie ante la presión de algún agente patógeno u otro estrés ambiental. Por lo que el uso de aereadores y de sistemas que eviten las caídas de oxígeno por debajo de este nivel es importante para el buen mantenimiento de los camarones dentro del sistema de cultivo.

Por otro lado, este trabajo demuestra la importancia que tiene la hipoxia aguda en el sistema inmune del camarón blanco, ya que por lo general todos los estudios realizados sobre este tema se enfocan principalmente en el estudio del efecto que tiene la hipoxia crónica, la cuál difícilmente se presenta en los sistemas de cultivo como ya se ha mencionado. También debe considerarse en estudios de este tipo el considerar variables asociadas al metabolismo para identificar de forma precisa en que momento los organismos se encuentran en déficit energético por hipoxia, ya que es en este punto donde ocurren los cambios metabólicos e inmunes en esta especie.

9. Conclusiones.

En camarón blanco la tasa de consumo de oxígeno durante un evento de hipoxia aguda es reducida cuando el nivel de oxígeno cae de 4-2.85 mg/L, por debajo de 2.85 mg/L esta es mantenida en un nivel bajo.

La cantidad de urea, amonio NO_2 y NO_3 excretada por *L. vannamei* se incrementa por efecto del ejercicio, y se modifica por la hipoxia, incrementándose los niveles de urea y reduciéndose los niveles de amonio.

Los niveles de lactato son incrementados cuando el nivel de oxígeno del agua se encuentra por debajo de los 0.5 mg/L, indicando que *L. vannamei* requiere ser sometido a niveles de oxígeno menores a 0.5 mg/L para sufrir una reducción en el metabolismo aeróbico.

Los niveles de lactato en hemolinfa reportados en este trabajo, son los mas altos reportados para esta especie cuando se presenta un nivel de oxígeno por debajo de 0.5 mg/L.

La glucosa en la hemolinfa se incrementa (hiperglicemia) ante un evento de hipoxia cuando los niveles de oxígeno están por debajo de 0.5 mg/L, así como por efecto del ejercicio en camarón blanco.

Los niveles de proteína y colesterol en los camarones no se ven modificados ante un evento de hipoxia aguda, bajo estas condiciones experimentales.

La actividad de la FO total, FO y proFO se ve reducida bajo condiciones de hipoxia, cuando el nivel de oxígeno es menor a 0.5 mg/L, pudiendo reducir la capacidad de respuesta inmune de *L. vannamei* bajo estas condiciones.

No se observa un efecto evidente por hipoxia en la CTH, sin embargo existe una tendencia de reducción de este parámetro y un incremento por efecto del ejercicio.

La actividad de la lisozima se ve reducida en un 63.27% bajo condiciones de hipoxia, cuando el oxígeno se encuentra por debajo de 0.5 mg/L.

Los nitritos en hemolinfa en camarón blanco no se ven afectados por el nivel de oxígeno en el agua, pero son incrementados con el movimiento de los organismos. Por su parte los nitratos no presentan una relación evidente ni con la hipoxia ni con el movimiento de los organismos.

10. Bibliografia.

Abbot, J.G. 1994. Mangrove ecosystems: prospects for conservation and rehabilitation in the context of historical uses, biology, and economics. Coastal Zone Canada 94' Cooperation in the Coastal Zone: Conference Proceeding. Vol.3. Coastal Zone Canada Association, NS Canada. 1096-1111.

Abramson, S., Amin, A., Clancy, R., Attur, M. 2001. The role of nitric oxide in tissue destruction. Best Practice and Research Clinical Rheumatology. 15 (5): 831-845.

Adamczewska, A. y S. Morris. 1994. Exercise in the terrestrial Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis*. Journal of Experimental Biology. 188: 257-274.

Akaike, T. y H. Maeda (2000). Nitric oxide and virus infection. Immunology. 101: 300-308.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. The molecular biology of the cell. Garland Science. USA. 1463 pp.

Alcaraz, G., Chiapa-Carrara, X., Vanegas, C. 1997. Temperature tolerance of *Penaeus setiferus* post-larvae exposed to ammonia and nitrite. Aquatic Toxicology. 39: 345-353.

Alcaraz, G., Espinoza, V., Vanegas, C. 1999. Acute effect of ammonia and nitrite on respiration of *Penaeus setiferus* post-larvae under different oxygen levels. Journal of the World Aquaculture Society. 30 (1): 98-106.

Amstrong, P., Melchor, R., Quigley, J. 1996. Humoral immunity in long-lived arthropods. Journal of Insect Physiology. 42 (1): 53-64.

Andrew, P. J. y B. Mayer. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovascular Research. 43: 521-531.

Arumugam, M., Romestand, B., Torreilles, J., Roch, P.2000. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. European Journal of Cell Biology. 79: 513-519.

Bacherè, E., Destoumieux, D., Bulet, P. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. Aquaculture. 191: 71-88.
Bacherè, E.2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture. 191: 3-11.

Barraco, M.A., Duvic, B., Söderhäll, K. 1991. The β -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. Cell and Tissue Research. 266 (3): 491-497.

- Bayne, Ch.J. 2003. Origins and Evolutionary Relationships Between the Innate and Adaptive Arms of Immune Systems. *Integrative Comparative Biology*. 43: 293-299.
- Bodgan, Ch. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature*. 2 (10): 907-916.
- Boutillier, R., y J. Pierre. 2000. Surviving hypoxia without really dying. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 126 A: 481-490.
- Boyd, C. E. 1998. Pond water aeration systems. *Aquacultural Engineering*. 18: 9-40.
- Boyd, C.E. 1990. *Water Quality in Ponds for Aquaculture*. Birmingham Publishing Co. USA. 482 pp.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bridges, C.R. y A.R. Brand. 1980. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of some marine crustacean. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 65A: 399-409.
- Butler, P., Taylor, E., McMahon, B. 1978. Respiratory and circulatory changes in the lobster (*Homarus vulgaris*) during long term exposure to moderate hypoxia. *Journal of Experimental Biology*. 73: 131-146.
- Calderón, C. 2004. Evaluación de los componentes moleculares de la excreción nitrogenada de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1921) en función de la actividad, pH, niveles de amonio y oxígeno. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 67 pp.
- Cameron, J.S., Hoffman, K., Zia, C., Hemmett, H., Kronsteiner, A., Lee, C. 2003. A role for nitric oxide in hypoxia-induced activation of cardiac K_{ATP} channels in goldfish (*Carassius auratus*). *The Journal of Experimental Biology*. 206: 4057-4065.
- Campa-Córdova^a, A., Hernández-Saavedra, N., De Philippis, R., Asencio, F. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*. 133: 557-565.
- Campa-Córdova^b, A., Hernández-Saavedra, N., De Philippis, R., Asencio, F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response of β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 353-366.
- Cardenas, W. y J. Dankert. 1997. Phenoloxidase specific activity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish and Shellfish Immunology*. 283-295.

- Cavalli, R.O. Peixoto, S.M., Wasielesky, W. 1998. Performance of *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante) broodstock under long-term exposure to ammonia. *Aquaculture Research*. 29: 815-822.
- Chakravorty, D. y M. Hensel. 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection*. 2: 621-627.
- Chen, J. y Ch. Lin. 1991. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus penicillatus* juveniles at two salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 100C. 3: 477-482.
- Chen, J. y Ch. Lin. 1992. Lethal effects of ammonia on *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 156: 139-148.
- Chen, J. y Ch. Lin. 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 Sh. Lei. 1990. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*. 21 (4): 300-306.
- Chen, J. y Y. Kou. 1992. Effects of ammonia on growth and molting of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture*. 104: 249-260.
- Chen, J. y Y. Kou. 1993. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*. 109: 177-185.
- Chen, J.C. y S.F. Chen. 1992. Accumulation of nitrite in the haemolymph of *Penaeus japonicus*. *Marine Ecology*. 83: 305-308.
- Chen^a, J. y Ch. Kou. 1996. Nitrogenous excretion in *Macrobrachium rosenbergii* at different pH levels. *Aquaculture*. 144: 155-164.
- Chen^b J. y T. Kou. 1996. Effect of temperature on oxygen consumption and nitrogenous excretion of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 145: 295-303.
- Cheng^b, W. y J. Chen. 2000. Effect of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*. 10: 387-391.
- Cheng, S. Y. y J. Chen. 2001. The time-course of nitrogenous excretion in the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure. *Aquatic Toxicology*. 51: 443-454.

- Cheng, W. y J. Chen. 2002. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 97-109.
- Cheng, W., Li, Ch., Chen, J. 2004. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 232:103-115.
- Cheng^a, S.Y. y J. Chen. 2000. Accumulation of nitrite in the tissues of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient nitrite after different periods. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 83-192
- Cheng^a, W., Ch. Liu., Hsu, J., Chen, J. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 13: 351-365.
- Cheng^a, W., Juang, F., Li, J., Lin, M., Liu, Ch., Chen, J. 2003. The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to the moult stage. *Aquaculture*. 218: 33-45.
- Cheng^b, Sh., Tsai, S., Chen, J. 2002. Accumulation of nitrate in the tissues of *Penaeus monodon* following elevated ambient nitrate exposure after different time periods. *Aquatic Toxicology*. 56: 133-146.
- Cheng^b, W., Liu, Ch., Kuo, Ch. 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture*. 220: 843-856.
- Chosa, N.; Fukumitsu, T.; Fujimoto, K.; Ohnishi, E. 1997. Activating of Prophenoloxidase A1 by an activatin Enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry Biology*. 21(1): 61-68.
- Coleman, J. W. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*. 1: 1397-1406.
- Colt, J., Armstrong, D. 1981. Nitrogen Toxicity to Crustaceans, Fish, and Molluscs. *Bio-engineering Symposium for Fish Culture*. 34-45.
- Dall, W. y D.M. Smith. 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*. 55: 23- 33.
- DeFur, P. y Ch. Magnum. 1978. The effects of environmental variables on the Herat rates of invertebrates.

Destoumieux^a, D., Munoz, M., Bulet, P., Bacherè, E. 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 1260-1271.

Destoumieux^b, D., Munoz, M., Cosseau, C., Rodríguez, J., Bulet, P. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Sciences*. 113: 461-469.

Dhabhar, F.S. 2002. A Hassle a Day May Keep the Doctor Away: Stress and the Augmentation of Immune Function. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 556-564.

Dunbar, S. y H. Huddart. 1982. Calcium movements in insect visceral muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 72A: 425-437.

Duvic, B. y K. Söderhäll. 1990. Purification and characterization of a β -1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Biological Chemistry*. 265: 9327-9337.

Duvic, B. y K. Söderhäll. 1993. β -1,3-glucan binding proteins from plasma of the freshwater crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *Journal of Crustacean Biology*. 13 (3): 403-408.

Eby, L.A. y L.B. Crowder. 2002. Hypoxia-based habitat compression in the Neuse River Estuary: context-dependent shifts in behavioral avoidance thresholds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 59: 952-965.

Fang, Y., Yang, S., Wu, G. 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*. 18: 872- 879.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. 144 pp.

Foster, M.F., Waldron, F.M., Taylor, H.H. 1989. Recovery from exhausting exercise in a bimodally breathing crab, *Leptograpsus variegates* (Decapoda:Grapsidae). 127: 165-173.

France, R.M., Sellers, D., Grossman, S.H. 1997. Purification, characterization and hydrodynamic properties of arginine kinase from gulf shrimp (*Penaeus aztecus*). *Archives of biochemistry and biophysics*. 345 (1): 73-78.

Fujita, T., Endo, Y., Nonaka, M. 2004. Primitive complement system: recognition and activation. *Molecular Immunology*. 41: 103-111.

Fukuhara, R., Tezuka, T., Kageyama, T. 2002. Structure, molecular evolution, and gene expression of primate superoxide dismutases. *Gene*. 296: 99-109.

Gäde, G. 1984. Effect of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 77A (3): 495-502.

Gastin, P. B. 2001. Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports Med*. 31 (10): 725-741.

Gnaiger, E. 2001. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration Physiology*. 128: 277-297.

Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F. 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 117A (3): 419-425.

Gollas-Galván, T., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comparative Biochemistry Physiology*. 122: 77-82.

Gollas-Galván, T., Sotelo-Mundo, R., Yepiz-Placencia, G., Vargas-Requena, F., Vargas-Albores, F. 2003. Purification and characterization of α 2-macroglobulin from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 134: 431-438.

Gómez-Jimenez, S., Uglow, R.F., Gollas-Galván, T. 2000. The effects of cooling and emersion and total hemocyte count and phenoloxidase activity in the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 10: 631-635.

Gourdon, I., M.-C. Guérin., Torreilles, J., Roch, P. 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*. 5 (1):1-6.

Greenberg, N., Carr, J., Summers, C. 2002. Causes and Consequences of Stress. *Integrative and Comparative Biology*. 42: 508-516.

Griffith, G.W. 1994. Phenoloxidases. En: *Progress in Industrial Microbiology*. Ed. Martinelli, S.D y J.R. Kinghorn. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. 29: 763-788.

Guzmán, A., Ascencio-Valle, F. 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Resent Res. Devl Microbiology*. 4: 333-348.

- Hammond, J. A. y V.J. Smith. 2002. Lipopolysaccharide induces DNA-synthesis in a sub-population of hemocytes from the swimming crab, *Liocarcinus depurator*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 227-236.
- Hanlon, D. 1975. The distribution of arginase and urease in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 52B: 261-264.
- Hannesson, R. 2003. Aquaculture and fisheries. *Marine Policy*. 27: 169-178.
- Henry, R., Booth, Ch., Lallier, F., Walsh, P. 1994. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *Journal of Experimental Biology*. 186: 215- 234.
- Hernández-López, J. 2001. Diseño de Técnicas para la Cuantificación de Moléculas Plasmáticas de Camarón. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 104 pp.
- Hernández-López, J., Gollas-Galvan T., Gómez-Jiménez, S., Portillo-Clark, G. Vargas-Albores, F. 2003. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 14: 105-114.
- Hernández-López, J.;Gollas-Galván, T.; Vargas-Albores, F. 1996. Activation of the prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Bioche. Physiology*.113C: 61-66.
- Hervant, F., Garin, D., Mathieu, J., Freminet, A. 1999. Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post- hypoxic recovery. *The Journal of Experimental Biology*. 202: 579-592.
- Higashi, Y. y M. Yoshizumi. 2004. Exercise and endothelial function: Role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacology and Therapeutics*. 102: 87-96.
- Hikima, S., Hikima, J., Rojtinnakorn, J., Hirono, I., Auki, T. 2003. Characterization and function of karuma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*. 316: 187-195.
- Hoffman, J. y J. Reichhart. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature*. 5 (2): 121-126.
- Holáň, V., Krulova, M., Zajicová, A., Pindjácová, J. 2001. Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immune system. *Molecular Immunology*. 38: 989-995.

Homblad, T. y K. Söderhäll. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*. 172: 111- 123.

Houlihan, D., Govind, C., El Haj, A. 1985. Energetics of swimming in *Callinectes sapidus* and walking in *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 82A (2): 267-279.

Jaenicke, E. y H. Decker. 2002. Tyrosinases from crustacea for hexamers. *Biochemical Journal*. BJ20021058 : 1-18.

Jensen, F.B. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. A. 135. 9.24.

Jeongmok, K., Marshal, M., Cheng-I, W. 2000. Polyphenoloxidase. En: *Seafood Enzymes. Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Ed. Norman F. Haard y B. Simpson. Marcel Dekker, Inc. USA. 271-315 p.

Johansson, M.W. y K. Söderhäll. 1989. Cellular immunity in crustacean and the proPO system. *Parasitology Today*. 5 (6): 171-176.

Johansson, M.W., P. Pia, Stritunyalucksana, K. Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*. 191: 45-52.

Jussila, J., McBride, S., Lago, J., Evans, L.H. 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Aquaculture*. 199: 185-193.

Kanost, R. M. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 23: 291-301.

Kautsky, N., P. Rönnbäck, Tedengren, M., Troell, M. 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*. 191: 145-161.

Koroleff, F. 1983. Determination of ammonia. *Methods of Seawater analysis*. Ed. Grashorff, K., Erhardt, M., KremLin, K. 150-157.

Kotlyar, S., Weihrauch, D., Paulsen, R.S., Towle, W. 2000. Expression of arginine kinase enzymatic activity and mRNA in gills of the euryhaline crabs *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus*. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 2395-2404.

Kröncke, K., Fehsel, K., Suschek, Ch., Kolb-Bachofen, V. 2001. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *International Immunopharmacology*. 1: 1407-1420.

- Lallier, F. y J.P. Truchot. 1989. Modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the prawn *Penaeus japonicus*. *Journal of Experimental Biology*. 147: 133-146.
- Lallier, F.H., Walsh, P.J., 1991. Activities of uricase, xanthine oxidase, and xanthine dehydrogenase in the hepatopancreas of aquatic and terrestrial crabs. *Journal of Crustacea Biology*. 11: 506–512.
- Larade, K. y K.B. Storey. 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. *Cell and Molecular Responses to Stress*. Ed. Storey, K.B. y J.M. Storey. Vol.3: Sensing, signaling and Cell Adaptation. Elsevier Press. Amsterdam. 27-46.
- Lavine, M.D y M.R. Strand. 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology*. 47: 965-974.
- Lavine, M.D. y M.R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 1295-1309.
- Lee, S., Wang, R., Söderhäll, K. 2000. A lipopolysaccharide- and β -1-3-glucan binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*, characterization and cDNA cloning. 275.2.(14): 1337-1343.
- Lee, W. y J. Chen. 2003. Hemolymph ammonia, urea and uric acid levels and nitrogenous excretion of *Marsupenaeus japonicus* at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 288: 39-49.
- Lee, W. y J. Chen. 2004. Nitrogenous excretion and arginase specific activity of kuruma shrimp *Marsopeneus japonicus* exposed to elevated ambient nitrite. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 308: 103-111.
- LeMoullac, G. y P. Haffner. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*. 191: 121-131.
- LeMoullac, G., Zoyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology*. 8: 621-629.
- Leonard, C., K. Söderhäll., N. Ratcliffe. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochemistry*. 15: 803–810.
- Lightner, D.V y T.A. Bell. 1988. *A handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. Ed. World Aquaculture Society. Lawrence, Kansas, USA.

- Lightner, D.V. y R.M. Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201-220.
- Lin, Y. y J. Chen. 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 259: 109-119.
- Liu, Ch. y J. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 16: 321-334.
- Liu, Ch., Yeh, S., Cheng, Sh., Chen, J. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection with the moult cycle. *Fish and Shellfish Immunology*. 2: 151-161.
- Lorenzon, S., Guarrini, S., Smith, V.J. Ferrero, E. 1999. Effect of LPS injection on circulating haemocytes in crustacean in vivo. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 31-50.
- Luckhart, S. y K. Lee. 2001. Transcriptional complexity of the *Anopheles stephensi* nitric oxide synthase gene. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 249-256.
- Lutz, P.L. y H. M. Prentice. 2002. Sensing and Responding to Hypoxia, Molecular and Physiological Mechanisms. *Integrative and Comparative Physiology*. 42: 463-468.
- Maeda, S., Miyauchi, T., Kakiyama, T., Sugawara, J., Iemitsu, M., Irukayama-Tomobe, Y., Murakami, H., Kumagai, Y., Kuno, S., Matsuda, M. 2001. Effect of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1, and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sciences*. 69: 1005- 1016.
- Magor, B. y K. Magor. 2001. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 651-682.
- Mahadevan, A., Lappé, J., Rhyne, R., Cruz-Bermúdez, N., Marder, E., Goy, M. 2004. Nitric oxide inhibits the rate and strength of cardiac contractions in the lobster *Homarus americanus* by acting on the cardiac ganglion. *The Journal of Neuroscience*. 24 (11): 2813-2824.
- Malham, Sh.,m Lacoste, A., Gélébart, F., Cueff, A., Poulet, S. 2003. Evidence for a Direct link between stress and immunity in the Mollusc *Haliotis tuberculata*. *Journal of Experimental Zoology*. 295A: 136-144.
- Mallon, E. B., Loosli, R., Schmid-Hempel, P.2003. Specific versus nonspecific immune defense in the bumblebee *Bombus terrestris* L. *Evolution*. 57: 1444-1447.

- Mathews, Ch. K. y E. E. van Holde. 1996. Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Co. USA. 1159pp.
- McLaughlin. 1983. Internal Anatomy. The Biology of Crustacea. Vol. 5. Ed. Mantel, L.H. Academic Press. USA. 1-49.
- McMahon^a, B.R. 2001. Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustacean. *Respiration Physiology*. 128: 349-364.
- McMahon^b, B.R. 2001. Control of cardiovascular function and its evolution in crustacean. *The Journal of Experimental Biology*. 204: 923-932.
- Melzer W., Herrmann-Frank, A., Luttgau, HC. 1995. The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochimica et Biophysica Acta*. 8.1241 (1): 59-116.
- Mikuski, Ch., Burnett, L., Burnett, K. 2000. The effects of hypercapnic hypoxia on the survival of shrimp challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Shellfish Research*. 19 (1): 301-311.
- Montaño-Pérez, K., Yepiz-Plascencia, G., Higuera-Ciapara, I., Vargas Albores, F. 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 122: 381-387.
- Morán, Ll. 2003. Níveis de ácido láctico en hemolinfa y músculo de camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes, 1900) en diferentes grados de hipoxia, alkalosis e hiperamonia. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 94pp.
- Muñoz, M., Cedeno, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W., Mialhe, E., Bacherè, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191: 89-107.
- Nappi, A., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*. 4 (4): 423-430.
- Neiland, A., Soley, N., Varley, J., Whitmarsh, D. 2001. Shrimp aquaculture: economic perspectives for policy development. *Marine Policy*. 25: 265-279.
- Nellaiappan, K. y M. Sugumaran. 1996. On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the Horseshoe Crab, *Limulus*. *Comp. Biochemistry Physiology*. 113B (1): 163-168.

- Nieto-Fernandez, F., Mattocks, D., Salzet, M., Cavani, F., Stefano, G. 1999. Morphine coupling to invertebrate immunocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 123B: 295–299.
- Nilsson, G.E. y G.M. Renshaw. 2004. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *Journal of Experimental Biology*. 15 (207): 3131-3139.
- Ocampo, L., Patiño, D., Ramírez, C. 2003. Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentrations in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology*. 296: 71-77.
- Olsen, Ø., Pilsen, I., Sletten, K., Myrnes, B. 2003. Multiple invertebrate lisozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. B. 136: 107-115.
- Onnen, Th. y E. Zebe. 1983. Energy metabolism in the muscles of the shrimp *Crangon crangon* during work and subsequent recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 74A (4): 833-838.
- Páez-Osuna, F., Gracia, A., Flores-Verdugo, F., Lyle-Fritch, L.P., Alonso-Rodríguez, R., Roque, A., Ruiz Fernández, A. 2003. Shrimp aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 806-815.
- Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties; biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*. 21: 265-499.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*. 218: 637-650.
- Pascual, C., Zenteno, E., Cuzon, G., Sánchez, A., Gaxiola, G., Tabeada, G., Suárez, J., Maldonado, T., Rosas, C. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture*. 236: 431-450.
- Perazzollo, L., Gargioni, R., Ogliairi, P., Barraco, M. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214: 19-33.
- Perazzolo, L. y M. Barraco. 1997. The profenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Developmental & Comparative Immunology*. 21: 385-395.

- Pérez-Rostro, C., Racotta, I., Ibarra, A. 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 302: 189-200.
- Phillips, J.W., McKinney, R.J., Hird, F., MacMillan, D. 1977. Lactic acid formation in crustaceans and the liver function of the midgut gland questioned. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 56B: 427-433.
- Pillai, B.R. y A.D. Diwan. 2002. Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp *Metapenaeus monoceros*. *Journal of Crustacean Biology*. 22 (1): 45-52.
- Pörtner, H. 2002. Environmental and functional limits to muscular exercise and body size in marine invertebrate athletes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 133: 303-321.
- Pörtner, H.O., Webber, D.M., O'Dor, R.K., Boutilier, R.G. 1993. Metabolism and energetics in squid (*Illex illecebrosus*, *Loligo pealei*) during muscular fatigue and recovery. *The American Physiology Society*. R157-R165.
- Quarmby, L.M. 1985. The influence of temperature and salinity on the nitrogenous excretion of the spot prawn *Pandalus platyceros* Brandt. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 87: 229-239.
- Racotta, I. S., Palacios, E., Méndez, L. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 35. 4: 269-275.
- Racotta, I. y R. Hernández-Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei* to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology. A*. 125: 437-443.
- Ramos, A., Remedi, M., Sánchez, C., Bonacci, Vides, M., Chiabrando, G. 1997. Inhibitory effects of human α 2-macroglobulin on *Trypanosoma cruzi* epimastigote proteinases. *Acta Tropica*. 68: 327-337.
- Randall, D., Burggren, W., French, K. 1998. *Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones*. McGraw-Hill. Madrid. 790 p.
- Regnault, M. y J. Aldrich. 1988. Short-term effect of hypoxia on ammonia excretion and respiration rates in the crab *Carcinus maenas*. *Marine Behaviour and Physiology*. 13: 257-271.

- Reiber, C.L. y B.R. McMahon. 1998. The effects of progressive hypoxia on the crustacean cardiovascular system: a comparison of the freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*), and the lobster (*Homarus americanus*). *Journal of Comparative Physiology B*. 168: 168-179.
- Reiber, C.L., McMahon, B.R., Burggren, W. 1997. Cardiovascular functions in two macruran decapod crustacean (*Procambarus clarkii* and *Homarus americanus*) during periods of inactivity, tail flexion and cardiorespiratory pauses. *The Journal of Experimental Biology*. 200: 1103-1113.
- Renoe, B.W., McDonald, J.M., Ladenson, J.H. 1980. The effects of stasis with and without exercise on free calcium, various cations, and related parameters. *Clinica Chimica Acta*. 103: 91-100.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*. 172: 125-145.
- Rodríguez, J. y G. Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 191:109-119.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Tabeada, G., Arena, L., van Wormhoudt, A. 2002. An energetic and conceptual modelo of the physiological role of dietary carbohidratos and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 268: 47-67.
- Rosas, C., Gaxiola, G., Sánchez A. 2000. El metabolismo del nitrógeno y su relación con los requerimientos nutricionales de los camarones peneidos. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez Estrada, C.J., Ricque-Marie, D., Cruz-Suarez, 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. 166-186.
- Rosas, C., Martinez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A., Soto, L.1999. The effect of dissoled oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Lennaeus) juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 234: 41-57.
- Sakurai, Y., Kanzawa, N., Maruyama, K. 1996. Characterization of myosin and paramyosin from crayfish fast and show muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 113B (1): 105-111.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*. 198: 13-28.

- Sanson, A., Mark M. 2003. Hypoxia increases nitric oxide concentrations that are not completely inhibited by L- NMMA. *Journal of Surgical Research*. 110: 202-206.
- Schofield, R., Lennon, Sh., Magyari, P., Pierce, G., Nichols, W. 2003. The effect of exercise training on endothelial function in coronary disease: Role of nitric oxide and endogenous antioxidants. *Vascular Disease, Hypertension, and Prevention*. 262-263A.
- Sengupta, R., Sahoo, R., Mukherjee, S., Regulski, M., Tully, T., Stuehr, D., Ghosh, S. 2003. Characterization of *Drosophila* nitric oxide synthase: a biochemical study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 306: 590-597.
- Sharma, M.L. y M.C. Neveu. 1971. Studies on the role of ornithine cycle and purine catabolism in urea biosynthesis in the freshwater crayfish *Orconectes rusticus*. *Comparative and Biochemistry and Physiology*. 40B: 863– 870.
- Shugar, D. 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of the lysozyme. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 8: 302-309.
- Smith, V. y R. S. Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. *Fish and Shellfish Immunology*. 2: 1-31.
- Smith, V., Brown, J., Hauton, C. 2003. Immunoestimulation in crustacean: does it really protect against infection? *Fish and Shellfish Immunology*. *In Press*. : 1-20.
- Söderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S., Söderhäll, K. 2003. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 27 (8): 661-672.
- Söderhäll, K. y L. Cerennius. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish. Dis*. 2: 3-23.
- Solórzano, L. 1968. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*. 14 (5): 799-781.
- Song, Y., Yu, Ch., Lien, T., Huang, Ch., Lin, M. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 14: 317-331.
- Sotelo-Mundo, R., Islas-Osuna, M., de la Re Vega, E., Hernández-López, J., Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G. 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*. 15 (4): 325-331.
- Spaargaren, D.H. 1982. The ammonium excretion of the shore crab *Carcinus maenas*, in relation to environmental osmotic condition. *Netherlands Journal of Sea Research*. 12 (2): 273-283.

- Sritunyalucksana, K. y K. Söderhäll. 2000. The proPO and clotting system in crustacean. *Aquaculture*. 191: 53-69.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y., Söderhäll, K. 2002. β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 26: 237-245.
- Sritunyalucksana, K., Sithisarin, P., Withayachumnarnkul, B., Flegel, T.W. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish and Shellfish Immunology*. 9: 21-30.
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., Fein, H. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess Reaction Assay. *Sensors*. 3: 279-284.
- Suzuki, T. y T. Furukohri. 1994. Evolution of phosphagen kinase: Primary structure of glycoamine kinase and arginine kinase from invertebrates. *Journal of Molecular Biology*. 237: 353-357.
- Tafalla, C., Gómez-León, B., Novoa, B., Figueras, A. 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 27: 197-205.
- Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P., Tew, K.D. 2002. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies, I. Arginine. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56: 439-445.
- Taylor, K., Schmitz, H., Reedy, M., Goldman, Y., Franzini-Amstrong, C., Sasaki, H., Tregear, R., Poole, K., Lucaveche, C., Edwards, R., Fan Chen, L., Winkler, H., Reedy, M. 1999. Tomographic 3D Reconstruction of Quick-Frozen, Ca^{+2} -Activated Contracting Insect Flight Muscle. *Cell*. 99: 421-431.
- Thörnqvist, P.O., Johansson, M.W., Söderhäll, K. 1994. Opsonic activity of cell adhesion proteins and β -1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*. 18(1): 3-12.
- Thorpe, K.E., Taylor, A.C., Huntingford, F.A. 1995. How costly is fighting? Physiological effects of sustained exercise and fighting in swimming crabs, *Necora puber* (L.) (Brachyura, Portunidae). *Animal Behavior*. 50: 1657-1666.
- Torreilles, V. y M. C. Guerin. 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish & Shellfish Immunology*. 9: 509-518.
- Truscott, R. y K. White. 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology*. 4: 455-461.

- Tseng, I. y J. Chen. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. Fish and Shellfish Immunology. *In Press*.
- Ueda, H., Urano, Y., Sakurai, T., Kizaki, T., Hitomi, Y., Ohno, H., Izawa, T. 2003. Enhanced expression of neuronal nitric oxide synthase in islets of exercise-trained rats. Biochemical and Biophysical Research Communications. 312: 794-800.
- Van Aardt, W. J. y C.T. Wolmarans, 1987. Effects of anoxia on the haemolymph physiology and lactate concentrations in the freshwater crab *Potamon warreni* Calman. Comparative Biochemistry and Physiology. 88A: 671-675.
- Van de Braak, K. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp. Tesis Doctoral. Wageningen Institute of Animal Sciences. The Netherlands. 159 pp.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J., Halliwell, B., Cross, C. 1997. Formation of Reactive Nitrogen Species during Peroxidase-catalyzed Oxidation of Nitrite A Potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. Journal of Biological Chemistry. 272 (12): 7617-7625.
- Vargas-Albores, F. y G. Yepiz-Plascencia. 1998. Shrimp Immunity. Trends in Comparative Biochemistry and Physiology. 5: 195-210.
- Vargas-Albores, F. y G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture. 191: 13-21.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A., Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology. 106A: 299-303.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Söderhäll, K. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) wich enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. Developmental and Comparative Immunology. 20(5): 299-306.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification and comparison of β -1,3-Glucan Binding Protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). Comparative Biochemistry and Physiology. 116B (4): 453-458.
- Vorbach, C., Harrison, R., Capecchi, M. 2003. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. Trends in Immunology. 24 (2): 512-517.

- Wachter, B. y B. McMahon. 1996. Haemolymph flow distribution, cardiac performance and ventilation during moderate walking activity in *Cancer magister* (DANA)(Decapoda, Crustacea). The Journal of Experimental Biology. 199: 627-633.
- Wannamaker, C.M. y J.A. Rice. 2000. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organism from the southeastern United States. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 249: 145-163.
- Weiske, J. y A. Wiesner. 1999. Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* hemocyte line. NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry. 3 (2): 123-131.
- Whitaker, J. 1994. Principles of Enzymology. for the Food Sciences. Marcel Dekker, Inc.USA. 625 pp.
- Wilcox, C. y A. Lange. 1995. Role of extracellular and intracellular calcium on proctolin-induced contractions in an insect visceral muscle. Regulatory Peptides. 56: 49-59.
- Wilkens, J., Dadvidson, G. Cavey, M. 1997. Vascular peripheral resistance and compliance in the lobster *Homarus americanus*. The Journal of Experimental Biology. 200: 477-485.
- Winston, G.W., Moore, M., Kirchin, M.A., Soverchia, C. 1996. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. Comparative Biochemistry Physiology. 113C (2): 221-229.
- Woods, J.A., Ceddia, Q., Lowder, T. 2000. Exercise-induced modulation of macrophage function. Immunology and Cell Biology. 78: 545-553.
- Woods, J.A., Lu, Q., Ceddia, M.A., Lowder, T. 2000. Exercise-induced modulation of macrophage function. Immunology and Cell Biology. 78: 545-553.
- Wright, P. A. 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. The Journal of Experimental Biology. 198: 273-281.
- Wu, R. S. 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin. 45: 35-45.
- Wu, R., Lam, P., Wan, K. 2002. Tolerance to, and avoidance of, hipoxia by the penaeid shrimp *Metapenaeus ensis*. Environmental Pollution. 118: 351-355.
- Wyss, M. y R. Kaddurah-Daouk. 2000. Creatine and Creatinine Metabolism. Physiological Reviews. 80 (3): 1107-1213.

Yamamoto, Y., Henrich, M., Snipes, R., Kummer, W. 2003. Altered production of nitric oxide and reactive oxygen species in rat nodose ganglion neurons during acute hypoxia. *Brain Research*. 961: 1-9.

Yigzaw, Y., Gielens, C., Préaux, G. 2001. Isolation and characterization of an α -macroglobulin from the gastropod mollusc *Helix pomatia* with tetrameric structure and preserved activity after methylamine treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1545: 104-113.

Zou, E., Du, N., Lai, W. 1996. The Effects of Severe Hypoxia on Lactate and Glucose Concentration in the Blood of the Chinese Freshwater Crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comparative Biochemistry Physiology*. 114A: 105-109.

Zou, H., Chang, Y., Chen, S., Yau, S., Shen, Y., Lee, Ch. 2002. Localization of NADPH-Diaphorase and Nitric Oxide Synthase Activity in the Eyestalk of the Crayfish, *Procambrus clarkia*. *Zoological Studies*. 41 (3): 244-250.

ANEXO



Fig. 1. Organismos sometidos a ejercicio por nado contracorriente.



Fig. 2. Enjaulamiento de los organismos.

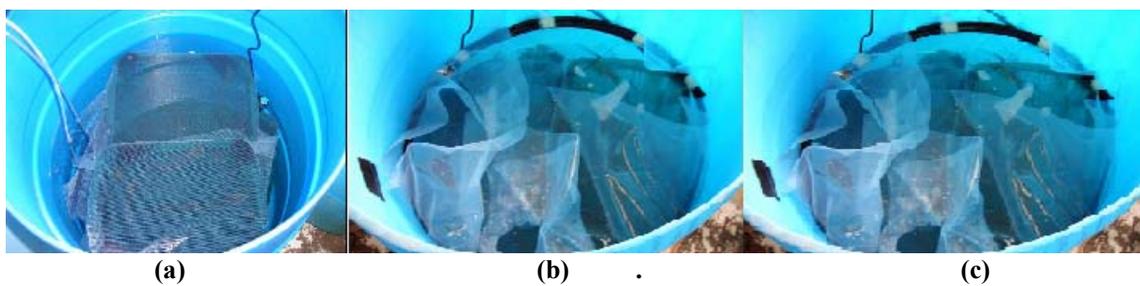


Fig. 3. Tanques de incubacion a los tratamientos: (a) tanque Normoxia, (b) tanque Hipoxia, (c) tanque RHipoxia.

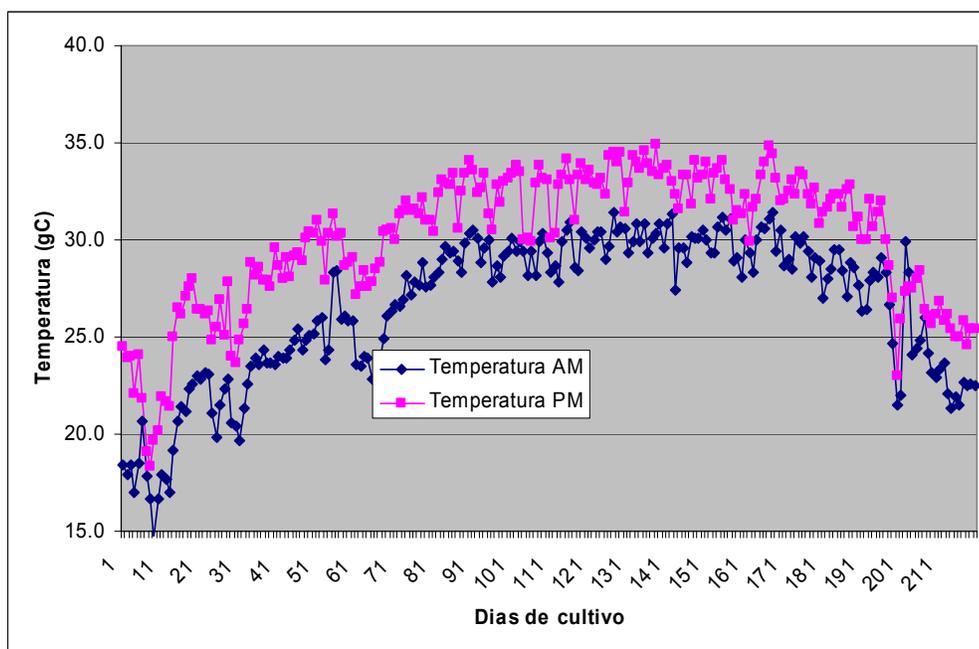


Fig. 4. Variación diurna y nocturna en la temperatura durante 221 días de cultivo en una granja de camarón en el Noroeste de México (amablemente proporcionada por el Biol. Francisco Magallon).

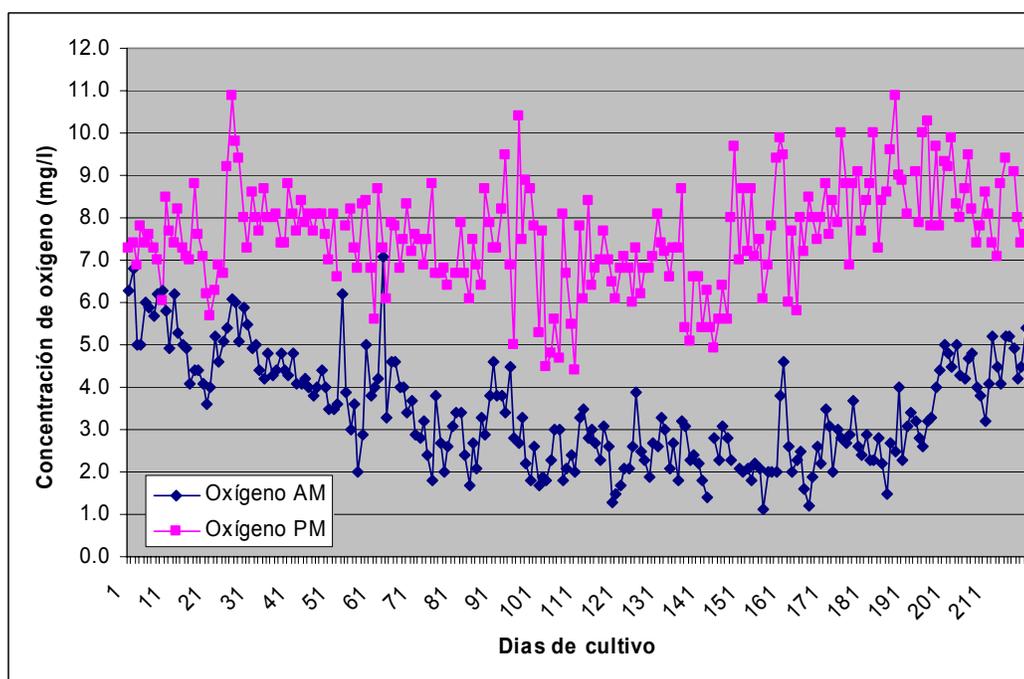


Fig. 5. Variación diurna y nocturna en el oxígeno disuelto durante 221 días de cultivo en una granja de camarón en el Noroeste de México (proporcionada por el Biol. Francisco Magallon).

Tabla I. Excreción nitrogenada en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de normoxia e hipoxia.

Tratamiento	Jaula	mg de O ₂ /L	Amonio (mg/L)	Urea (mg/L)	Nitritos(µg/L)	Nitratos(µg/L)
Normoxia	C	5.82	0.078	52.449	0.908	0.000
	E	5.72	3.541	62.140	1.933	0.360
	1	5.64	0.187	4.276	0.862	0.035
	2	5.66	0.171	0.000	0.442	0.093
	3	5.56	0.270	0.570	0.687	0.000
	4	5.66	0.361	5.701	0.652	0.000
	5	5.63	0.410	1.425	0.419	0.000
Hipoxia	6	5.68	0.330	3.991	0.466	0.186
	Libres	5.73	0.314	2.850	0.675	0.000
	1	3.72	0.111	18.243	0.442	0.000
	2	2.97	0.155	20.523	0.466	0.000
	3	1.93	0.319	6.556	0.745	0.000
	4	0.93	0.263	13.397	0.629	0.209
	5	0.45	0.097	15.108	0.512	0.000
Control Agua	6	0.32	0.221	12.257	0.582	0.070
	Libres	0.3	0.219	7.411	1.141	0.012
Control Agua	1	5.85	0.017	0.000	0.439	0.013

Tabla II. Niveles de lactato y glucosa en hemolinfa de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de normoxia e hipoxia.

Tanque	Jaula	mg de O ₂ /L	Lactato (mg/dL)*	Err.Std	Glucosa (mg/dL)*	Err.Std
Normoxia	C	5.82	2.235	1.67	11.813	1.44
	E	5.72	2.551	1.67	17.913	1.52
	1	5.64	1.878	2.36	29.883	1.86
	2	5.66	3.878	2.36	18.246	1.86
	3	5.56	5.141	2.36	15.441	1.86
	4	5.66	3.743	2.36	15.585	1.86
	5	5.63	3.464	2.36	14.051	1.86
Hipoxia	6	5.68	5.683	2.64	17.060	2.27
	Libres	5.73	5.434	2.64	16.477	2.27
	1	3.72	22.922	2.36	23.608	2.27
	2	2.97	5.029	2.16	20.898	2.03
	3	1.93	5.213	2.64	15.291	2.27
	4	0.93	5.569	2.16	18.918	1.86
	5	0.45	7.344	2.64	33.139	1.86
RHipoxia	6	0.32	32.043	2.36	40.976	1.72
	Libres	0.3	74.460	3.05	57.689	2.27
	1	3.78	15.681	2.03	25.907	2.04
	2	2.45	5.717	1.86	17.952	2.04
	3	1.64	6.871	1.86	15.464	2.04
	4	0.82	11.543	2.03	16.911	2.04
	5	0.45	11.128	1.86	16.734	2.28
	6	0.39	41.207	2.27	38.233	2.04

Diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$) se indican con un asterisco (*).

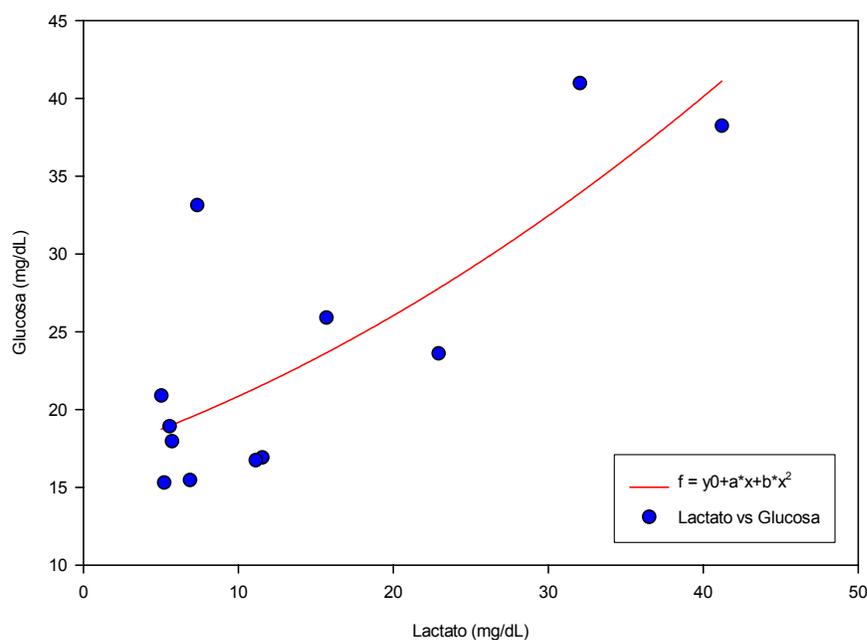


Fig. 6. Regresión cuadrática significativa ($p=0.0093$, $R^2=0.64665$) entre los niveles de glucosa (mg/dL) y los niveles de lactato (mg/dL).

Tabla III. Valores obtenidos de la Actividad de la FO total, FO, proFO y $\alpha 2$ -Macroglobulina en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de normoxia e hipoxia.

Tratamiento	Jaula	mg de O ₂ /L	FO Tot*	Err.Std	FO	Err.Std	proFO*	Err.Std	$\alpha 2M^*$	Err.Std
Normoxia	C	5.82	0.149	0.017	0.036	0.003	0.112	0.019	27.491	1.406
	E	5.72	0.168	0.017	0.034	0.003	0.134	0.019	19.002	1.334
	1	5.64	0.319	0.024	0.041	0.004	0.275	0.027	20.821	1.887
	2	5.66	0.270	0.027	0.038	0.004	0.262	0.027	19.001	1.722
	3	5.56	0.184	0.024	0.037	0.004	0.176	0.030	16.947	1.722
	4	5.66	0.143	0.022	0.039	0.004	0.105	0.024	17.204	1.722
	5	5.63	0.167	0.024	0.036	0.004	0.133	0.027	14.675	1.887
Hipoxia	6	5.68	0.179	0.022	0.049	0.004	0.144	0.027	17.745	1.722
	Libres	5.73	0.181	0.027	0.044	0.005	0.137	0.030	***	***
	1	3.72	0.179	0.022	0.038	0.004	0.132	0.024	17.290	1.722
	2	2.97	0.189	0.024	0.036	0.004	0.193	0.024	24.800	1.722
	3	1.93	0.157	0.024	0.036	0.004	0.121	0.027	27.666	1.887
	4	0.93	0.098	0.022	0.035	0.004	0.050	0.024	26.924	2.110
	5	0.45	0.134	0.022	0.032	0.004	0.102	0.024	17.740	1.722
Hipoxia	6	0.32	0.045	0.022	0.029	0.004	0.017	0.024	18.875	1.722
	Libres	0.3	0.064	0.027	0.029	0.005	0.035	0.030	***	***

Diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p<0.05$) se indican con un asterisco (*).

Tabla IV. Conteo Total de Hemocitos (CTH) en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de normoxia e hipoxia.

Tratamiento	Jaula	mg de O ₂ /L	CTH (cel x10 ⁶)*	Err.Std
Normoxia	C	5.82	7.913	1.078
	E	5.72	10.889	1.078
	1	5.64	10.491	1.244
	2	5.66	11.078	1.363
	3	5.56	13.000	1.760
	4	5.66	14.163	1.363
	5	5.63	13.853	1.244
Hipoxia	6	5.68	15.703	1.244
	1	3.72	18.775	1.244
	2	2.97	16.906	1.244
	3	1.93	9.172	1.524
	4	0.93	15.154	1.244
	5	0.45	13.022	1.244
	6	0.32	5.522	1.244

Diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$) se indican con un asterisco (*).

Tabla V. Concentración de nitritos en hemolinfa en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de normoxia e hipoxia.

Tratamiento	Jaula	mg de O ₂ /L	Nitritos (µM/L)*	Err.Std
Normoxia	C	5.82	1.902	0.150
	E	5.72	2.632	0.142
	1	5.64	2.443	0.201
	2	5.66	2.011	0.201
	3	5.56	1.761	0.183
	4	5.66	1.932	0.183
	5	5.63	1.352	0.201
	6	5.68	1.426	0.225
	Libres	5.73	2.374	0.225
	Hipoxia	1	3.72	2.535
2		2.97	1.609	0.183
3		1.93	1.445	0.225
4		0.93	2.055	0.201
5		0.45	1.579	0.201
6		0.32	1.427	0.183
Libres		0.3	2.422	0.225

Diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$) se indican con un asterisco (*).

Tabla VI. Concentración de nitratos en hemolinfa en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en condiciones de normoxia e hipoxia.

Tratamiento	Jaula	mg de O ₂ /L	Nitratos (µM/L)*	Err.Std
Normoxia	C	5.82	0.277	0.223
	E	5.72	0.287	0.236
	1	5.64	0.000	0.273
	2	5.66	0.789	0.273
	3	5.56	0.427	0.334
	4	5.66	0.234	0.299
	5	5.63	1.705	0.273
	6	5.68	0.000	0.273
	Libres	5.73	0.210	0.386
	Hipoxia	1	3.72	0.000
2		2.97	0.299	0.299
3		1.93	0.946	0.299
4		0.93	0.271	0.273
5		0.45	1.935	0.273
6		0.32	0.176	0.273
Libres		0.3	0.000	0.386

Diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$) se indican con un asterisco (*).