



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EFECTO DEL ACIDO ARAQUIDÓNICO SOBRE LA
SUSCEPTIBILIDAD AL ESTRÉS POR ALTA
DENSIDAD, LA PRODUCCIÓN DE PGE₂ Y LA
RESPUESTA INMUNE DEL CAMARÓN BLANCO
DEL PACIFICO *Litopenaeus vannamei***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

Verónica Aguilar Medina

La Paz, B.C.S., julio de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 17 del Mes de Junio del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto del ácido araquidónico sobre la susceptibilidad al estrés por alta densidad, la producción de PGE₂ y la respuesta inmune del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*"

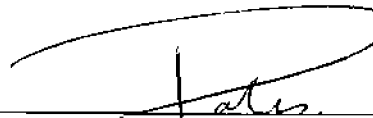
Presentada por la alumna:

Verónica Aguilar Medina

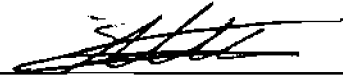
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuacultura

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

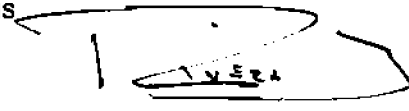
LA COMISION REVISORA



Elena Palacios Mechetnov
DIRECTORA DE TESIS



Ilie S. Racotta Dimitrov
CO-TUTOR



Roberto Civera Cerecedo
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité Tutorial y Comité Revisor de Tesis

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Ilie Racotta Dimitrov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Roberto Civera Cerecedo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Jurado de Exámen

Dra. Elena Palacios Mechetnov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Ilie Racotta Dimitrov
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Roberto Civera Cerecedo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Suplente

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

RESUMEN

En la camaronicultura, las altas densidades de cultivo son deseables para incrementar la producción. Sin embargo, el estrés que se deriva de estas prácticas afecta negativamente el crecimiento y la salud del camarón, particularmente la respuesta inmune. Esto ha sido ligado al estrés físico (hacinamiento) y fisicoquímico (hacinamiento aunado al deterioro de la calidad de agua). El objetivo del presente trabajo fue separar los efectos físico y fisicoquímico del estrés por alta densidad de cultivo en juveniles del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, además de probar el efecto de suplementar el alimento con ácido araquidónico (ARA) como alternativa para disminuir los efectos negativos del estrés. Se realizaron dos experimentos simultáneos: en el primer experimento se cultivaron camarones por 30 días en tanques de concreto divididos por una malla gruesa que permitía el paso del agua, asignando bajas y altas densidades en cada mitad para obtener la misma calidad de agua y observar solo el efecto del hacinamiento. En el segundo experimento se usaron tanques divididos pero ambas mitades ya sea con baja o alta densidad y así observar además el efecto de la calidad de agua. En los dos experimentos se utilizaron dietas con un nivel bajo (0.8%) y alto de ARA (3.2%) y se analizaron periódicamente amonio, temperatura, oxígeno disuelto y el consumo de alimento: la temperatura se mantuvo constante entre las densidades, pero el oxígeno disuelto disminuyó al aumentar la densidad y el amonio incremento con la densidad.

Al cabo de 30 días, se muestrearon los camarones, se pesaron y midieron y se analizó la respuesta metabólica (concentraciones de glucosa, lactato, triacilglicéridos, lípidos totales, glucógeno, proteínas totales y hemocianina) e inmune (conteo total de hemocitos, anión superóxido, tiempo de coagulación) en hemolinfa y tejidos; así como la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos y lípidos de reserva de los hemocitos. El ARA es precursor de prostaglandinas de la serie II (PGE₂) que afectan el sistema inmune por lo que se evaluó la PGE₂ en plasma y hemocitos.

La alta densidad de cultivo afectó negativamente el crecimiento en los dos experimentos, pero el efecto fue mayor en el fisicoquímico. La sobrevivencia no fue afectada en ninguno de los experimentos. En el experimento físico los camarones alimentados con un nivel bajo de ARA mostraron una mayor concentración de glucosa y lactato en hemolinfa. La alta densidad de cultivo provocó una menor concentración de lactato en hepatopáncreas y glucógeno en músculo en camarones mantenidos a una alta densidad de cultivo en el experimento físico. En el experimento fisicoquímico se observó una interacción con una mayor concentración de glucógeno en hepatopáncreas a alta densidad de cultivo y niveles altos de ARA, y una mayor concentración de glucógeno en músculo a alta densidad de cultivo y nivel bajo de ARA. No se encontraron efectos significativos sobre anión superóxido en los organismos del experimento físico, pero si en el experimento fisicoquímico, donde hubo una interacción con una mayor producción en organismos alimentados con la dieta baja en ARA y una menor producción con la dieta alta en ARA. El tiempo de coagulación fue afectado por la dieta en ambos experimentos, siendo menor en los organismos que fueron alimentados con la dieta alta en ARA. La concentración de PGE₂ en plasma fue mayor para los organismos alimentados con la dieta alta en ARA en organismos del experimento físico, pero en el experimento fisicoquímico no hubo

diferencias significativas en relación a la dieta o la densidad. Los niveles de ARA en la dieta tuvieron un efecto significativo en los niveles de ARA en lípidos de reserva y en los fosfolípidos de hemocitos y en los niveles de ARA en los fosfolípidos en el experimento fisicoquímico.

En conclusión, el estrés físico por hacinamiento probablemente representó un estrés moderado a largo plazo que los camarones enfrentaron poniendo en marcha algunos mecanismos metabólicos e inmunes, algunos posiblemente modulados por la presencia de ARA en las membranas de los hemocitos. En contraste, el estrés fisicoquímico afectó en un mayor grado a los organismos, en los cuales posiblemente los mecanismos inmunes y metabólicos ya no fueron suficientes para contrarrestar el estrés, por lo que se observaron efectos negativos a nivel de consumo de alimento y crecimiento. La alimentación con el nivel alto de ARA revirtió la disminución del crecimiento de los organismos cultivados a alta densidad en el experimento fisicoquímico y disminuyó el tiempo de coagulación.

Palabras claves: Calidad de agua, eicosanoides, estrés, hacinamiento, HUFA, respuesta metabólica, prostaglandinas, sobrevivencia.

ABSTRACT

High stocking densities are highly desirable to increase yields in shrimp culture. However, concomitant stress negatively affects shrimp growth and health and particularly, immune response. The stress has been associated to physical (crowding) and to a physicochemical effect (crowding and poor water quality). The aim of the present work was to separate the physical and physicochemical stress of high stocking density in the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*, and to test the effect of supplying arachidonic acid (ARA) in the diet to decrease the negative effect of stress. Two experiments were simultaneously performed: in the first, shrimp were raised for 30 days in concrete tanks divided by a hard mesh that allowed water circulation; low or high densities were assigned to each one half of the tank in a way that the water was circulating between both groups but the crowding was different. In a second experiment, both halves of each tank were used for either high or low shrimp density, so in addition to crowding, the effect of water quality was observed. In addition, in both experiments diets enriched with a low (0.8%) and high ARA (3.2%) content were offered. Ammonia, temperature, dissolved oxygen, and feed consumption were analyzed periodically; temperature was constant among densities, but dissolved oxygen decreased as density increased, and ammonia increased at higher densities.

After 30 days, shrimp were measured and weighted and metabolic (glucose, lactate, triacylglycerides, total lipids, glycogen, total proteins, and hemocyanin) and immune response (total hemocyte count, superoxide anion, and clotting time) in hemolymph and tissues were analyzed; as well as hemocyte fatty acid composition in phospholipids and reserve lipids. ARA is a precursor of prostaglandins from the series II (PGE₂) which affects the immune system, so PGE₂ was assessed in hemocytes and plasma.

The high stocking density negative affected shrimp growth in both experiments, but the effect was more evident in the physicochemical experiment. Survival was not affected in either experiment. In the physical experiment, shrimp fed the low ARA diet showed a higher glucose and lactate concentration in hemolymph and a lower concentration of lactate in hepatopancreas and glycogen in muscle. In the physicochemical experiment an interaction was found, with higher glycogen levels in hepatopancreas in shrimp at higher density and fed the high ARA levels, and higher glycogen concentration in muscle in shrimp at higher density and fed the low ARA diet. Anion superoxide was not significantly affected in shrimp from the physical experiment, but an interaction was observed in shrimp from the physicochemical experiment, with higher production in shrimp fed the low ARA diet and lower production in shrimp fed the high ARA diet. The clotting time was affected by diet in both experiments, with lower values in shrimp fed the low ARA diet. In the physical experiment, PGE₂ concentration in plasma was higher in shrimp fed the high ARA diet, but in the physicochemical experiment there were no significant differences for PGE₂ levels ARA levels in the diet or density. The ARA levels had significant effect on the phospholipids and reserve lipids in the physicochemical experiment and on the ARA levels of phospholipids in the physical experiment.

In conclusion, shrimp in the physical experiment were exposed to a long-term crowding stress, and responded by modifying metabolic and immune response, some of them

possibly modulated by the ARA levels in the membranes of hemocytes. In contrast, shrimp in the physicochemical experiment exposed to a crowding and poor water quality stress, were more stressed and the immune and metabolic response was probably not enough, and thus, negative effects were observed on food consumption and growth. Feeding shrimp high levels of ARA reverted some of these negative effects, increasing growth and decreasing clotting time.

Keywords: crowding, eicosanoids, HUFA, metabolic response, prostaglandins, stress, survival, water quality.

LISTA DE ACRÓNIMOS

ACRÓNIMO	SIGNIFICADO
ARA	Ácido araquidónico
BF ₃	Trifluoruro de boro
COX	Ciclooxigenasa
CTH	Cuenta total de hemocitos
Cyt P-450	Vía citocromo P-450
DHA	Ácido docosahexaenoico
EIA	Inmuno ensayo enzimático
EP	Receptor de prostaglandinas de la serie 2 (EP ₁ , EP ₂ , EP ₃ y EP ₄)
EPA	Ácido eicosapentaenoico
HDL-BGP	High Density Lipoprotein-Beta Glucan Binding Protein
HETE	Acido hidroxieicosatetraenoico
HPTE	Acido hidroperoxieicosatetraenoico
HUFA	Ácidos grasos altamente insaturados
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
LOX	Lipooxigenasa
OD	Oxígeno disuelto
OH	Radicales hidroxilo
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PGES	Prostaglandin-sintetasas
PGE ₂	Prostaglandina tipo E de la serie 2.
PLA ₂	Fosfolípasa A ₂
Σ SAT	Sumatoria total de ácidos grasos saturados
Σ MUFA	Sumatoria total de ácidos grasos monoinsaturados
Σ PUFA	Sumatoria total de ácidos grasos poliinsaturados
ups	Unidades prácticas de salinidad

DEDICATORIA

A mi bebe, mi pedacito de cielo.

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos SEP-CONACYT 43249 y 49191 sin los cuales no hubiera sido posible la presente investigación.

Al departamento de Posgrado del CIBNOR por su apoyo para asistir a un congreso y a Leticia, Osvelia, Beatriz y Claudia por su atención cada vez que lo necesité.

A Horacio y Manuel por su buena disposición y las facilidades otorgadas en el centro de cómputo.

Al programa de mejoramiento genético del CIBNOR por el préstamo de las instalaciones para la realización de los experimentos.

A los técnicos: Pablo Monsalvo, Marcos Quiñonez, Roberto Hernández y Ernesto Goytortúa.

A la Dra. Elena Palacios Mechetnov quiero expresarle mi más profundo agradecimiento por su dedicada labor, sus atinados comentarios y por transmitirme una gran confianza. Le agradezco también el haberme brindado siempre los medios suficientes para la realización de esta tesis.

A mis asesores Dr. Ilie Racotta Dimitrov por la asesoría brindada y al Dr. Roberto Civera Cerecedo por su gran apoyo en la elaboración de las dietas experimentales.

A Olivia Arjona, Laurence Mercier, Atzín Carreño, Miguel Hurtado, Mónica Reza por su valiosa enseñanza en las técnicas de laboratorio.

A mis compañeros y amigos de la maestría especialmente a Getzabeth, Ana, Nadia, Yssel, Paulina, Mónica, Arlet y Angie, por su agradable compañía.

A la Pilarika, por ser como es, por escuchar, atender y entender mis locuras, por las horas que hemos pasado juntas y por las grandes experiencias compartidas. Muchas gracias amiga!

A Oli por su calidez, comprensión y constante estímulo.

A mi familia, especialmente a mi madre por su amor incondicional.

A mis amigas de siempre Cleo, Gaby por tantos años de amistad y aunque estén lejos siempre les siento cerca.

ÍNDICE

	Páginas
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1. Camarón blanco del Pacífico	5
2.2. Estrés, respuesta metabólica e inmune	6
2.3. Sistema inmune en camarones	8
2.4. Inmunoestimulantes	10
2.5. Ácidos grasos poliinsaturados	11
2.6. Acido araquidónico y prostaglandinas	13
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPOTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
VI. METODOLOGÍA	20
6.1. Dietas experimentales	20
6.1.1. Formulación	20
6.1.2. Fabricación	22
6.1.3. Composición química proximal	23
6.2. Diseño experimental	26
6.2.1. Primer experimento: (estrés físico)	27
6.2.2. Segundo experimento: (estrés fisicoquímico)	28
6.3. Muestreo	30
6.3.1. Variables metabólicas en hemolinfa	30
6.3.2. Ácidos grasos en hemocitos	30
6.3.3. Estadio de muda	31
6.3.4. Variables metabólicas en tejidos	31
6.3.5. Capacidad osmorreguladora	31
6.3.6. Variables inmunes	32
6.3.7. Prostaglandinas E ₂	32
6.4. Análisis	33
6.4.1. Determinación de amonio	33
6.4.2. Determinación de ácidos grasos en las dietas	34
6.4.3. Variables metabólicas en hemolinfa	35

6.4.4. Variables metabólicas en tejidos	38
6.4.5. Variables inmunes	40
6.4.6. Análisis de ácidos grasos en hemocitos	41
6.4.7. Determinación de PGE ₂	42
6.5. Análisis estadístico	42
VII. RESULTADOS	44
7.1. Comparación de variables fisicoquímicas entre los dos experimentos	44
7.2. Estrés físico	47
7.2.1. Desempeño biológico	47
7.2.2. Variables metabólicas	51
7.2.3. Ácidos grasos en hemocitos	53
7.2.4. Variables inmunes	56
7.2.5. Prostaglandinas E ₂	59
7.3. Estrés fisicoquímico	61
7.3.1. Desempeño biológico	61
7.3.2 Variables metabólicas	65
7.3.3. Ácidos grasos en hemocitos	67
7.3.4. Variables inmunes	70
7.3.5. Prostaglandinas E ₂	73
VIII. DISCUSIÓN	77
IX. CONCLUSIONES	94
X. RECOMENDACIONES	96
XI. REFERENCIAS	97
XII. ANEXOS	114

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1	Producción de camarón peso vivo en toneladas.	2
Figura 2	Ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico. 1.- Adulto, 2.- Huevo; 3.- Nauplio; 4.- Protozoa; 5.- Misis; 6.- Postlarva 7.- Juvenil.	6
Figura 3	Metabolismo de ácidos grasos esenciales n-3 y n-6.	12
Figura 4	Síntesis de eicosanoides (Stanley y Miller, 2006).	14
Figura 5	Sistema experimental en el laboratorio de Biología Reproductiva de Organismos acuáticos.	25
Figura 6	Distribución de los organismos en las unidades experimentales en el experimento 1, de estrés físico. Las flechas indican intercambio de agua en las unidades experimentales y los números, la densidad de cultivo.	27
Figura 7	Distribución de los organismos en las unidades experimentales en el experimento 2, de estrés físico-químico. Las flechas indican intercambio de agua en las unidades experimentales y los números, la densidad de cultivo.	28
Figura 8	Temperatura (°C) promedio en los tanques durante la realización de los experimentos físico (16-68) y físico-químico (16-16 y 68-68).	45
Figura 9	Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹) promedio en los tanques durante la realización de los experimentos físico (16-68) y físico-químico (16-16 y 68-68).	45
Figura 10	Concentración de amonio (mg L ⁻¹) promedio de los tanques durante la realización de los experimentos físico y fisicoquímico.	46
Figura 11	Peso final (promedio ± error estándar) de juveniles de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidades de cultivo (16 y 68 org m ⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.	48
Figura 12	Ganancia en peso (%) (promedio ± error estándar) en juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m ⁻²), alimentados con	49

dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

- Figura 13 Longitud final (cm) (promedio \pm error estándar) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²), alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 49
- Figura 14 Número de mudas por organismo durante los 30 días de bioensayos (promedio \pm error estándar) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²), alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 50
- Figura 15 Consumo de alimento (promedio \pm error estándar) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²), alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 50
- Figura 16 Número de hemocitos totales y anión superóxido (promedio \pm error estándar) analizados en juveniles de camarones *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés físico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 57
- Figura 17 Tiempo de coagulación (promedio \pm error estándar) analizado en juveniles de camarones *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés físico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 58
- Figura 18 PGE₂ (promedio \pm error estándar) analizadas en plasma y hemocitos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés físico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 60
- Figura 19 Peso final (g, promedio \pm error estándar) de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 62
- Figura 20 Ganancia en peso (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA. 62

Figura 21	Longitud final (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.	63
Figura 22	Consumo de alimento (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.	64
Figura 23	Número de mudas por organismo durante los 30 días de bioensayos (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco <i>Litopenaeus vannamei</i> sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.	64
Figura 24	Número de hemocitos totales y anión superóxido (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarones <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados a baja (barras blancas) y alta densidad (barras grises) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA, sometidos a un estrés fisicoquímico.	71
Figura 25	Tiempo de coagulación (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarones <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados a baja (barras blancas) y alta densidad (barras grises) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA, sometidos a un estrés fisicoquímico.	72
Figura 26	PGE ₂ (promedio \pm error estándar) analizadas en plasma y hemocitos de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> sometidos a un estrés fisicoquímico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m ⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.	74

LISTA DE TABLAS

		Páginas
Tabla I	Taxonomía del camarón blanco del Pacífico.	5
Tabla II	Formulación y composición química proximal esperada de las dietas experimentales.	21
Tabla III	Composición química proximal de las dietas con un contenido bajo y alto en ARA.	23
Tabla IV	Principales ácidos grasos de las dietas experimentales con un contenido bajo y alto de ácido araquidónico.	25
Tabla V	VARIABLES metabólicas (promedio \pm error estándar) medidas en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> de camarones alimentados con dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo.	52
Tabla VI	Principales ácidos grasos (% , promedio \pm error estándar) en la fracción neutra de los hemocitos de camarones alimentados con dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo.	54
Tabla VII	Principales ácidos grasos (% promedio \pm error estándar) en la fracción polar de los hemocitos de camarones alimentados con dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo.	55
Tabla VIII	Principales ácidos grasos (% , promedio \pm error estándar) en la fracción polar de los hemocitos de los camarones alimentados con las dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo.	66
Tabla IX	Principales ácidos grasos (% , promedio \pm error estándar) en la fracción neutra de los hemocitos de los camarones alimentados con las dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo.	68

Tabla X	VARIABLES metabólicas medidas en hepatopáncreas y músculo de juveniles de <i>Litopenaeus vannamei</i> . Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.	69
Tabla XI	Resumen de las variables medidas en juveniles de camarón <i>L. vannamei</i> , sometidos a un estrés físico, alimentados con dietas baja y alta en ácido araquidónico.	76
Tabla XII	Resumen de las variables medidas en juveniles de camarón <i>L. vannamei</i> , sometidos a un estrés fisicoquímico, alimentados con dietas baja y alta en ácido araquidónico.	76
Tabla XIII	Comparación de niveles letales de amonio (96LC ₅₀) en distintas especies de peneidos.	79
Tabla XIV	VARIABLES bioquímicas en hemolinfa con anticoagulante mal preparado (0.5% de oxalato de sodio). Datos reportados como media \pm error estándar. Se indica el coeficiente de variación entre paréntesis.	116

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad encaminada a la producción controlada o semicontrolada de especies acuáticas marinas y de agua dulce que son destinadas para diversos fines, entre ellos, la alimentación, recreación, estudio y/o conservación de algunas especies en peligro de extinción. En la actualidad, China, India y Vietnam son los principales productores de especies cultivadas de importancia comercial (FAO, 2008).

Dentro de estas especies el camarón ocupa un lugar importante, ya que su cultivo se considera una actividad sumamente rentable en todo el mundo debido a las grandes ganancias que genera. En los últimos años se ha visto un crecimiento acelerado en la producción de este crustáceo ya que en términos de divisas generadas, es el segundo en importancia después de los peces de agua dulce. Entre los países más productivos en esta actividad se encuentran China, India, Indonesia y Japón (FAO, 2004).

La camaronicultura en nuestro país ha crecido a una tasa media superior del 110% en los últimos 10 años. En el año de 1997, México producía menos de 18 mil toneladas de camarón cultivado, sin embargo, para el año 2004 las granjas acuícolas superaron la producción de todo el camarón silvestre que se obtenía (Fig. 1). Para el cierre del 2008 se calcula una producción cercana a las 120 mil toneladas, lo que es equivalente a más del triple de lo que actualmente se captura en el mar (CONAPESCA/SAGARPA 2008).

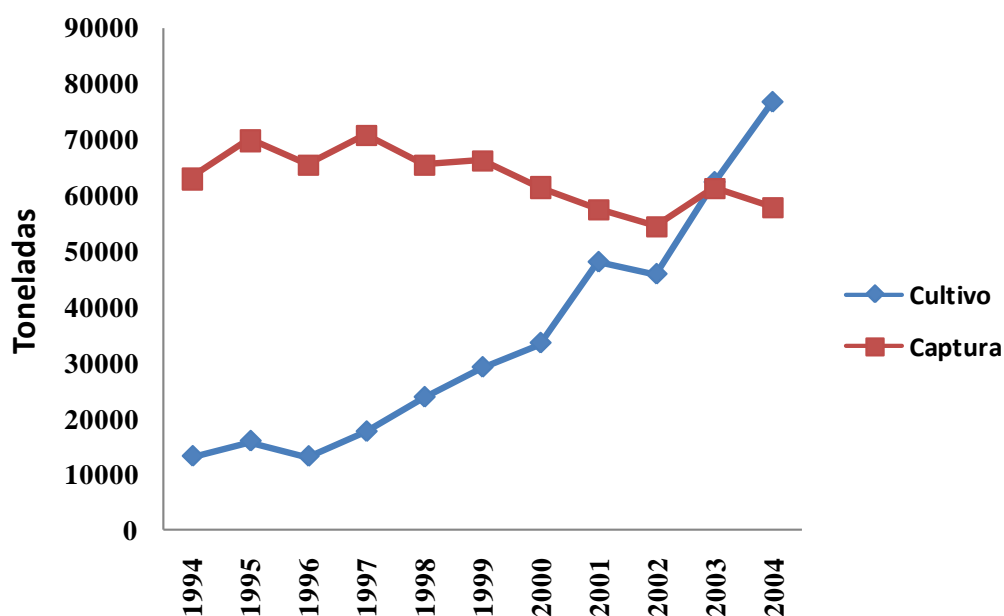


Figura 1. Producción de camarón peso vivo en toneladas (www.industriaacuicola.com)

La creciente necesidad de obtener mayor producción de biomasa por unidad de superficie cultivada, que supere las obtenidas con los sistemas extensivos y semiintensivos, ha llevado a la intensificación de los cultivos. Sin embargo, los cultivos intensivos se han relacionado con la manifestación un estrés fisiológico causado a los animales, que se manifiesta como baja eficiencia de alimentación y bajo crecimiento, que los pueden predisponer a infecciones, enfermedades y altas mortalidades (Williams *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 1998). Este tipo de resultados perjudiciales para la industria camaronícola, se han generado por el rápido avance en la implementación de las técnicas de crianza, engorda y reproducción, producto de un interés que día con día se incrementa en los productores,

antes que la generación de conocimientos en fisiología, inmunología y ecología del organismo (Bachère, 2000).

Las altas densidades de cultivo producen estrés en los camarones dado que combinan fluctuaciones de uno o varios parámetros en los estanques, tales como disminución en la concentración de oxígeno disuelto, o acumulación de compuestos derivados de la excreción de los organismos, que resultan potencialmente tóxicos, como el amonio (Le Moullac y Haffner, 2000; Horowitz y Horowitz, 2001). Los factores físicos causados por el hacinamiento de los organismos: interferencia física/mecánica, competencia por los recursos, canibalismo; en conjunto con los factores fisicoquímicos que determinan la calidad de agua: temperatura, oxígeno disuelto, pH, amonio, etc. son identificados como causantes de estrés en cultivos a alta densidad. A su vez, el estrés se ha sido vinculado con la aparición de enfermedades. Así, existen ejemplos de coexistencia entre camarón y bacterias que en condiciones normales pueden ser parte de su microflora normal y que solo causan enfermedades hasta que el camarón se encuentra afectado por una situación de estrés (Lightner y Redman, 1998).

Asimismo, diversos trabajos discuten la influencia del estrés sobre la respuesta inmune del camarón (Le Moullac y Haffner, 2000; Pascual *et al.*, 2003) y concluyen que induce a un estado de inmunosupresión, en términos de disminución en los parámetros inmunes. Como consecuencia, se ha propuesto el uso de una variedad de aditivos que incluyen bacterias vivas o muertas, glucanos, lipopolisacáridos y alginatos como inmunoestimulantes, basados en resultados experimentales que indican que su utilización conduce a una mejor respuesta a las enfermedades en distintas especies de crustáceos (Song *et al.*, 1997; Itami *et al.*, 1998;

Chang *et al.*, 2000; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2004, 2005; Montero Rocha, 2006). Estos aditivos han sido administrados ya sea por inmersión, como suplemento dietético o por inyección, aunque se ha preferido la administración oral, ya que la administración por inyección resulta ser laboriosa y costosa e implica manipulación de los organismos.

Recientemente, se han propuesto los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés) como capaces de modular e incrementar la respuesta inmune (Calder 1998, 2001). Por ejemplo, el ácido araquidónico (ARA), un HUFA de la serie n-6, es precursor de eicosanoides, los cuales se ha demostrado que son mediadores del sistema inmune en mamíferos e invertebrados como insectos (Calder, 2001; Stanley y Miller, 2006). Uno de los principales eicosanoides derivados del ARA es la prostaglandina PGE₂ y se ha demostrado que en peces la administración de ARA produce incrementos en los niveles de PGE₂ y una mejor respuesta al estrés ambiental (Bell y Sargent, 2003).

En el presente trabajo se investigaron los efectos físico y fisicoquímico del estrés crónico por alta densidad de cultivo sobre variables metabólicas e inmunes de *Litopenaeus vannamei* y la probabilidad de aumentar la capacidad de respuesta inmune de los camarones estresados al suplementar en la dieta un nivel alto de ARA.

II. ANTECEDENTES

2.1. Camarón blanco del Pacífico

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, perteneciente a la familia de los camarones peneidos (Tabla I), es la especie más cultivada en el mundo. Es una especie nativa de la costa Oeste del Océano Pacífico, con una distribución geográfica desde Sonora, en el Golfo de California, México, hasta Perú (Martínez Cordova, 1999). Tolera ampliamente las condiciones ambientales de cautiverio, presenta buenos rendimientos de crecimiento y alta sobrevivencia, lo que la convierte en una de las especies de camarón por elección para los sistemas de cultivo semiintensivo e intensivo (Williams *et al.*, 1996).

Tabla I. Taxonomía del camarón blanco del Pacífico

Phylum	Arthropoda
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>vannamei</i>

El ciclo de vida del camarón blanco (Fig. 2) se lleva a cabo entre la zona estuarina y el mar abierto. La reproducción inicia en mar abierto; el macho deposita un paquete de esperma (espermatóforo) que fertiliza los huevos de la hembra, que maduran y pasan a través de una serie de estadios larvales: seis estadios de nauplio, tres estadios de protozoa, tres estadios de mysis y varios estadios de postlarvas (Kitani, 1986). Este último asemeja a un camarón adulto que se moverá en dirección a los estuarios donde encontrará las condiciones óptimas

para continuar su desarrollo: mayor disponibilidad de alimento, protección contra los depredadores, temperatura y salinidad óptimos entre otros. Las postlarvas se desarrollaran hasta juveniles en los estuarios para posteriormente migrar al mar e iniciar su maduración sexual y actividad reproductiva.

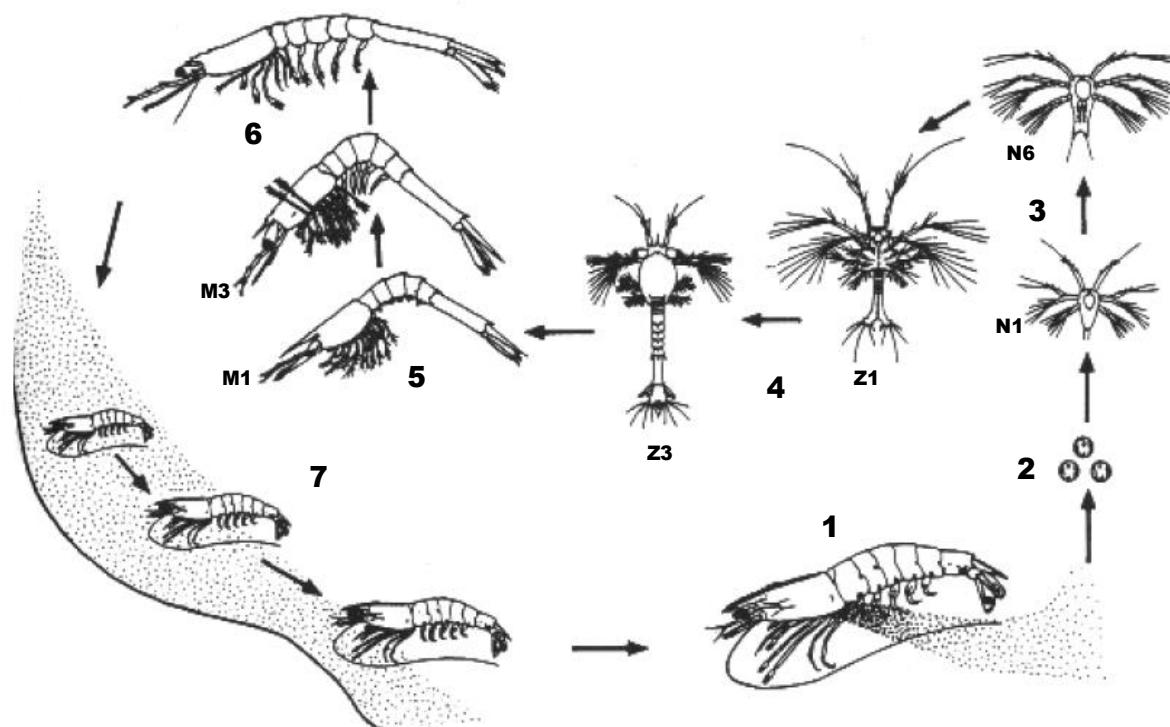


Figura 2. Ciclo de vida del camarón blanco del Pacífico. 1.- Adulto, 2.- Huevo; 3.- Nauplio; 4.- Protozoa; 5.- Mysis; 6.- Postlarva 7.- Juvenil.

2.2. Estrés, respuesta metabólica e inmune

El estrés se define como una alteración del equilibrio dinámico (homeostasis), inducido por estímulos externos e internos, llamados estresores (Pickering, 1981). Los estímulos producen una serie de respuestas que en vertebrados se caracterizan por una fase inicial, primaria u hormonal, seguida por un periodo de resistencia, conocido como respuesta

secundaria o metabólica. Dependiendo de la magnitud y duración del estresor, se proseguirá a la última fase de respuesta terciaria, en la que se afecta la condición general del organismo, a nivel de su capacidad de respuesta inmune, crecimiento y reproducción (Pickering, 1981; Ross y Ross, 1999). El estímulo se puede clasificar de acuerdo a su duración: Cuando éste se presenta de forma prolongada ya sea de manera repetitiva o continua (días, semanas), se considera que produce un estrés crónico. Por el contrario, cuando el estímulo solo se presenta por un corto tiempo de manera puntual (minutos a horas), se considera que produce un estrés agudo.

La respuesta primaria u hormonal en vertebrados es mediada por el sistema nervioso, que a su vez activa el sistema endocrino, liberando hormonas al torrente sanguíneo. En peces, la activación en los centros cerebrales resulta en una liberación masiva de catecolaminas y corticoesteroides (Wendelaar Bonga, 1997). En crustáceos la respuesta hormonal al estrés es menos conocida que en vertebrados en general aunque también podría implicar la participación de catecolaminas (Aparicio-Simón, 2009).

La respuesta secundaria o metabólica ha sido estudiada en camarones cultivados y algunas variables son consideradas como potenciales indicadoras de estrés para diferentes especies. En camarones, se han reportado los niveles de glucosa y lactato en hemolinfa, dada su sensibilidad y rápida variación en respuesta a una diversidad de estresores; entre ellos, exposición al aire (anoxia aguda), hipoxia y muestreos repetidos (Hall Van Ham 1998; Racotta y Palacios, 1998; Racotta *et al.*, 2002). Por otro lado, variables como hemocianina, proteínas, lípidos totales, triacilglicéridos y colesterol han sido usados mas bien como indicadores del estado nutricional (Rosas *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003).

En relación a la respuesta terciaria, se ha documentado la influencia del estrés sobre la respuesta inmune en crustáceos, usando como estímulos externos exposiciones a hipoxia (Le Moullac, 1998; Jiang *et al.*, 2005), cambios de temperatura y salinidad (Pascual *et al.*, 2003; Perazolo *et al.*, 2002), altas concentraciones de amonio (Liu y Chen, 2004), aclimatación al cautiverio (Sánchez *et al.*, 2001), manipulación (Perazzolo *et al.*, 2002, Mercier *et al.*, 2006) y alta densidad de cultivo (Li *et al.*, 2006).

Se considera que la alta densidad de cultivo como una situación de estrés debido a que eleva diversos agentes estresores que se pueden dividir en factores físicos, como la competencia de recursos, espacio o en casos extremos canibalismo (Piyatiratitivorakul *et al.*, 2001) y en factores químicos, como la acumulación de productos de excreción, que se acumulan en el agua de cultivo y tienen efectos tóxicos para el organismo (Ray y Chen, 1992; Nga *et al.*, 2005).

2.3. Sistema inmune en camarones

El sistema inmune en vertebrados está constituido por una respuesta específica, que incluye memoria adaptativa, inmunoglobulinas específicas y células especializadas, así como una respuesta no específica a través de células fagocíticas y células NK (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). En contraste, los crustáceos no poseen memoria adaptativa; su mecanismo de defensa, clasificado como innato, está basado en componentes humorales y celulares del sistema circulatorio que se encargan de la detección y eliminación de patógenos extraños (Soderhall y Cerenius, 1992; Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000). Entre los componentes humorales se encuentran especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos y enzimas reguladoras de procesos inmunes, por

mencionar algunos. Dentro de los componentes celulares capaces de reconocer y destruir organismos invasores, están los hemocitos (análogos a los glóbulos blancos de los vertebrados) con funciones como reconocimiento, melanización, coagulación, fagocitosis, encapsulación y comunicación entre células (Le Moullac *et al.*, 1998; Johansson *et al.*, 2002). Los hemocitos de crustáceos decápodos han sido clasificados morfológicamente basados en la presencia de gránulos citoplasmáticos, en tres categorías: hialinos, semigranulares y granulares, y cada tipo es activo en reacciones de defensa (Johansson *et al.* 2000). Su porcentaje puede variar de especie a especie, sin embargo en la mayoría, incluyendo *L. vannamei*, las células semigranulares son las más abundantes (Heng y Lei, 1998; Vargas Albores *et al.*, 2005). El número de hemocitos circulantes o conteo total de hemocitos (CTH) se considera una variable inmune de importancia dado que es afectado por factores intrínsecos y extrínsecos, tales como el ciclo de muda, consumo de alimento, estación del año o enfermedades (Cheng y Chen, 2001). Se ha reportado que los organismos con un alto CTH o número de hemocitos circulantes en la hemolinfa, resisten mejor a la infección por patógenos (Le Moullac *et al.*, 1998).

La fagocitosis es la reacción más común para la defensa celular dado que elimina microorganismos o partículas extrañas de la hemolinfa. La eliminación de partículas fagocitadas involucra la liberación de enzimas que reducen las moléculas de oxígeno y subsecuentemente se generan intermediarios reactivos de oxígeno, como anión superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , y radicales OH (Rodríguez y Le Moullac, 2000; Muñoz *et al.*, 2000). Este último proceso es conocido como estallido respiratorio y tiene un papel importante como actividad microbicida (Muñoz *et al.*, 2000). El primer intermediario de

oxígeno reactivo es el O_2^- o anión superóxido que ha sido reportado en hemocitos de diferentes especies de peneidos, y en particular, en *L. vannamei* (Muñoz *et al.*, 2000; Liu y Chen, 2004; Liu *et al.*, 2004; Tseng y Chen, 2004).

Otro proceso importante en la defensa de los crustáceos es la coagulación, que evita la pérdida de hemolinfa y el ingreso de microorganismos. El factor de coagulación de los crustáceos es un dímero de aproximadamente 400 kDa, que se reticula bajo la acción de una proteína tipo transglutaminasa liberada por los hemocitos (Maldonado *et al.*, 2004)

2.4. Inmunoestimulantes

Desde hace algunos años ha crecido el interés en el descubrimiento de compuestos que confieran protección y/o mejoren la reactividad inmune, con el objetivo de prevenir o minimizar los efectos que causan las enfermedades en el cultivo de crustáceos. Estas sustancias han sido denominadas inmunoestimulantes por su capacidad de activar o mejorar las defensas de un organismo. La activación de estas funciones inmunológicas está asociada a una manifestación en contra de las enfermedades y está reportado que pueden suscitar la recuperación de un estado de inmunosupresión causado por estrés (Sakai, 1999). Se han realizado numerosas pruebas donde se administran inmunoestimulantes generalmente por inmersión o vía oral como componentes de la dieta. Así, se ha reportado un efecto sobre sobrevivencia, crecimiento, tolerancia a estrés y respuesta inmune en estudios que administran bacterias vivas o muertas del género *Vibrio* (Sung *et al.*, 1996), β -glucanos provenientes de hongos y levaduras (Song *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2004; 2005), peptidoglucanos y lipopolisacáridos de paredes bacterianas (Sritunyalucksana *et al.*, 1999; Campa-Cordova *et al.*, 2002). De manera reciente, se ha relacionado la función de los

HUFA como inmunoestimulantes en camarones, dado que favorecen su resistencia a algún tipo de estrés físico o ambiental (Chim *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, en prensa).

2.5. Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos cuya estructura básica está conformada por un grupo carboxilato hidrófilo unido a un extremo de una cadena hidrocarbonada (Mathews *et al.*, 2002). Se pueden clasificar en saturados (sin dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada), monoinsaturados (un doble enlace) y poliinsaturados (dos o más dobles enlaces). Los poliinsaturados pueden además separarse en otro grupo cuando presentan 4 o más dobles enlaces, son llamados altamente poliinsaturados (HUFA).

Los ácidos grasos insaturados que tienen su primer doble enlace en las posiciones n-3 ó n-6, a partir del extremo hidrofóbico son considerados esenciales para los animales, dada la ausencia o la baja actividad de la enzima desaturasa que introduce los dobles enlaces en estas posiciones (Satarr *et al.*, 1998). Como consecuencia, los animales deben de consumir ácido linoleico (18:2n-6) y el α -linolénico (18:3n-3), que son metabolizados por reacciones de elongación y desaturación a ácidos grasos insaturados de cadena larga, con más de 20 carbonos, como el ácido araquidónico (20:4n-6 ARA), el ácido eicosapentanoico (20:5n-3 EPA), y el ácido docosahexaenoico (22:6n-3 DHA) (Fig. 3). Algunos organismos como los peces marinos y los crustáceos tienen una capacidad limitada de sintetizar HUFA a partir del ácido linoleico y linolénico y en estos casos, los ácidos grasos esenciales son los HUFA, tales como el ARA, EPA y DHA y deben ser incluidos en la alimentación (D'Abramo, 1997).



Figura 3. Metabolismo de ácidos grasos esenciales n-3 y n-6

La suplementación de HUFA en la dieta de camarones peneidos produce mejores resultados de crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés por cambio de temperatura y salinidad (Xu *et al.*, 1994, Kontara *et al.*, 1997; Wouters *et al.*, 1997; Chim *et al.*, 2001; González-Félix *et al.*, 2002). Sin embargo, el suplemento de HUFA enfocados a mejorar la respuesta inmune en camarones peneidos no ha sido estudiado sistemáticamente, solo existen algunos trabajos como el de Chim *et al.* (2001), donde se exponen juveniles de *L. stylirostris* a una

disminución progresiva de temperatura y salinidad durante 4 días y se obtienen valores mas altos de osmolaridad, actividad de anión superóxido y título de aglutinación del plasma en los camarones alimentados con una dieta alta (1.4%) en HUFA n-3. Ellos proponen que los HUFA permiten la modificación de la membrana celular, lo cual ayuda a una mejor adaptación y resistencia de los camarones durante un estrés ambiental. En un estudio realizado por Mercier *et al.*, (en prensa) se alimentaron juveniles de *L. vannamei* con dietas con niveles bajo y alto (0.07 y 2.1%) en HUFA, y se sometieron durante 30 días a un estrés crónico por manipulación. Se concluyó que el enriquecimiento con niveles altos de HUFA incrementó hasta cierto punto la tolerancia al estrés, dado que atenuó el efecto negativo del estrés sobre la sobrevivencia y afectó la respuesta inmune al incrementar los niveles de HDL-BGP (por las siglas en inglés High Density Lipoprotein-Beta Glucan Binding Protein).

2.6. Acido araquidónico y prostaglandinas

El ARA puede encontrarse en mayores proporciones en aceites vegetales y en las carnes, así como en aceites de tocino y cebo (Tacon, 1987; González-Felix *et al.*, 2004). El ARA es precursor de eicosanoides, tales como las prostaglandinas, que tienen un papel importante en el fenómeno de inflamación en mamíferos (Calder, 2001). El ARA generalmente se encuentra unido a fosfolípidos que forman parte de las membranas celulares. Su concentración en forma libre dentro de la célula es muy baja, cuando se necesita se libera de los fosfolípidos mediante fosfolipasas que son activadas por diferentes estímulos físicos, químicos y hormonales. La fosfolipasa A₂ (PLA₂) hidroliza la unión éster de los fosfolípidos, particularmente los que contienen fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y

fosfatidiletanolamina y liberan ARA. Una vez liberado, la vía de síntesis puede tomar dos direcciones: la vía de la lipooxigenasa (LOX) o la vía de la ciclooxigenasa (COX). Por la vía COX se producen prostaglandinas y tromboxanos, mientras que por la vía LOX se forman leucotrienos, lipoxinas, hepoxilinas, ácido hidroxicieicosatetraenoico (HETEs) y ácido hidroperoxicieicosatetraenoico (HPETEs) y la vía citocromo P-450 (Cyt P-450) formando derivados epoxi (Stanley y Miller, 2006; Fig. 4).

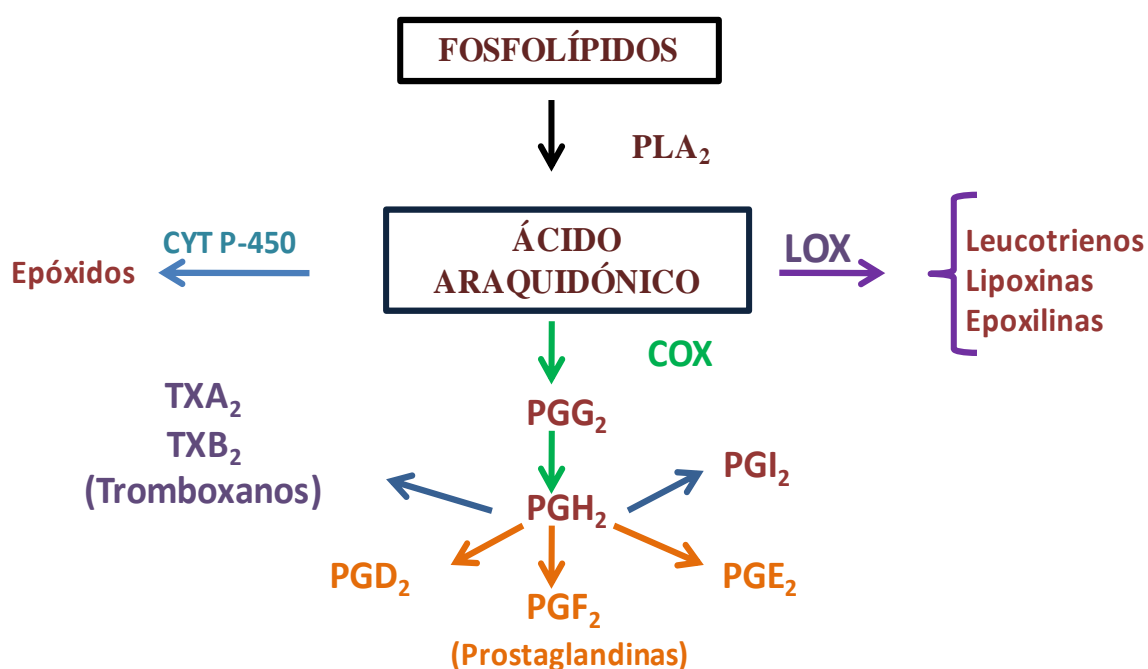


Figura 4. Síntesis de eicosanoides (Stanley y Miller, 2006)

El metabolito mas conocido del ARA es la prostaglandina de la serie 2, PGE₂ formada por una reacción tipo LOX con una introducción de oxígeno en el carbono 11 (Samuelsson, 1982). La síntesis está regulada por tres reacciones enzimáticas: 1) El ARA es almacenado en la posición 2 de los glicerofosfolípidos de la membrana y es liberado por la acción

hidrolítica de la enzima PLA₂, 2) El ARA es metabolizado a un prostanoide intermedio inestable, el PGH₂, por la acción de la ciclooxigenasa (COX) y luego a varios prostanoides secundarios por medio de enzimas específicas terminales PG-sintetasas (la PGE-sintetasa (PGES) convierte PGH₂ a PGE₂ específicamente), 3) Las PGE₂ producidas son entonces liberadas de las células y actúan en cuatro tipos de receptores PGE (EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄) (Murakami y Kudo, 2004) ubicados en el exterior de las membranas.

Existe una variedad de trabajos en insectos (ver revisión Stanley y Miller, 2006) diseñados para inhibir las rutas de biosíntesis de prostaglandinas. En dichos experimentos, se observó inhibición de la capacidad de los organismos para remover infecciones bacterianas de la hemolinfa, y se probó que el efecto se revertía al suministrar ARA. Basados en sus resultados, ellos sugieren que los eicosanoides son mediadores del sistema inmune en insectos (reacciones de microagregación y nodulación en respuesta a infecciones) y deducen que esto podría ser posible en otros invertebrados. También en insectos, se reportó que las prostaglandinas, y no los productos de la LOX, son mediadores en la migración de hemocitos (Phelps *et al.*, 2003; Merchant *et al.*, 2007).

Mientras que el papel del ARA y la síntesis de prostaglandinas han sido relativamente bien estudiados en mamíferos e insectos, las funciones en organismos acuáticos son menos conocidas. En peces se ha sugerido que el ARA y la producción de prostaglandinas de la serie 2, son importantes para obtener una respuesta apropiada al estrés ambiental (Bell y Sargent, 2003). Koven *et al.* (2001) mostraron que al alimentar larvas de dorada *Sparus aurata* con rotíferos enriquecidos con emulsiones de ARA, éstas tenían una menor mortalidad cuando eran sometidas a estrés por manipulación, en comparación con aquellas

a las que no se les proporcionó el alimento enriquecido. Los mismos autores en el 2003, encontraron una correlación positiva entre el incremento de ARA en la dieta y la sobrevivencia al final de un experimento donde expusieron a larvas de *S. aurata* a estrés por manejo y cambios diarios de salinidad, y propusieron que la producción de PGE₂ reguló la síntesis de cortisol, a través del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal mejorando la respuesta ante el estrés agudo.

En moluscos, Delaporte *et al.* (2006) encontraron que la suplementación de ARA por adición directa al agua de cultivo llevó a un incremento en el número de hemocitos, fagocitosis y producción de especies reactivas de oxígeno en el ostión *Crassostrea gigas*, y sugirieron que esta respuesta podría estar modulada por los eicosanoides derivados del ARA. En concordancia, Hurtado *et al.* (2009) en el ostión *C. corteziensis* observaron un incremento de PGE₂ en organismos alimentados con alga enriquecida con ARA.

En crustáceos decápodos, hasta el momento solo existe un estudio realizado por Buzoianu *et al.* (2006), donde miden la actividad fenoloxidasa en hemolinfa del acocil *Cambarellus montezumae* en ausencia y presencia de inhibidores de eicosanoides. Estos autores encontraron que la actividad de la PLA₂ decae en presencia de dexametasona, se inhibe la producción de eicosanoides y disminuye significativamente la actividad fenoloxidasa. Sin embargo, las investigaciones del papel de las prostaglandinas en camarón se han dirigido más que nada hacia la reproducción, como el caso de Tahara e Yano, (2003) donde observaron que el nivel de las prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2 α} varía en relación al estado de desarrollo de los ovarios en el camarón kuruma *P. japonicus*.

III. JUSTIFICACIÓN

La importancia económica del camarón ha creado el interés de incrementar la producción durante la engorda, lo cuál está ligada a la intensificación de los cultivos. Sin embargo, esta práctica puede representar una condición de estrés debido a los cambios en los factores fisicoquímicos en los estanques de cultivo que a la larga pueden disminuir el crecimiento y producir una baja sobrevivencia. Sin embargo, con un recambio de agua adecuado se puede disminuir el impacto negativo parte de los factores químicos, y los camarones estarían expuestos solamente a factores físicos relacionados con la alta densidad. Es necesario evaluar si la mayor parte del efecto de la intensificación se debe a los factores químicos, o si los factores físicos también pueden tener un efecto nocivo sobre el camarón.

Además, el identificar y detectar los cambios en las variables metabólicas durante una situación de estrés, permitirá usarlas como indicadores y poder tomar medidas convenientes para contrarrestar este tipo de efecto en los organismos.

Finalmente, el evaluar si el suplemento del alimento con ácido araquidónico tienen un efecto positivo sobre la respuesta inmune, en particular en condiciones de estrés por alta densidad de cultivo en *L. vannamei*, nos permitirá diseñar dietas que incrementen la resistencia al estrés y ayudará a reducir las enfermedades causadas por microorganismos oportunistas durante el cultivo de camarón.

IV. HIPÓTESIS

1) Los efectos negativos del cultivo de camarón a alta densidad se deben a los factores químicos, los cuales causan un estrés en los organismos y disminuyen su capacidad de respuesta inmune afectando negativamente el crecimiento y sobrevivencia de *L. vannamei*. En contraste, los efectos sobre los camarones por factores físicos afectarán el crecimiento por competencia de espacio y alimento.

2) Ofrecer dietas suplementadas con ácido araquidónico incrementará la producción de PGE₂. Las dietas suplementadas con ácido araquidónico, ya sea a través del incremento en PGE₂, o por otros eicosanoides, disminuirán la susceptibilidad del camarón ante un estrés crónico por alta densidad de cultivo al aumentar la eficiencia de los mecanismos de defensa inmune.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Disociar entre los efectos físico y fisicoquímico implicados en el estrés por alta densidad y del suplemento de ARA en el alimento sobre la producción de PGE₂ y su efecto sobre las respuestas metabólica e inmune en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos particulares

- 1) Determinar el efecto de un estrés crónico producido por alta densidad de cultivo, sobre la supervivencia, crecimiento, indicadores metabólicos e inmunológicos en camarón.
- 2) Diferenciar en el estrés por alta densidad, los efectos físico (interacción entre organismos) y químico (calidad del agua) sobre las variables anteriormente mencionadas.
- 3) Analizar el efecto de suplementar el alimento con ARA sobre la supervivencia, crecimiento, indicadores metabólicos e inmunológicos del camarón.
- 4) Evaluar si los niveles de PGE₂ varían en relación a los niveles de ARA en la dieta y si dichos niveles están correlacionados con indicadores metabólicos e inmunológicos.

VI. METODOLOGÍA

6.1. DIETAS EXPERIMENTALES

6.1.1. Formulación

Se formularon dos dietas balanceadas usando el paquete MIXIT-WIN (Agricultural Software Consultants, San Diego, CA, USA), teniendo como base la dieta control reportada en Goytortúa-Bores (2000), el cual tiene las cantidades de nutrientes recomendadas por varios autores (Akiyama y Dominy, 1989; Camba *et al.*, 1993) para juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Los alimentos se diseñaron con bajo y alto contenido de ARA (Tabla II), y para ello se utilizaron mezclas de emulsiones base ICES (Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, Ghent University, Gent, Bélgica) 0/-/C, 30/0.6/C y ARA. En ambos alimentos se mantuvieron constantes los niveles de DHA y EPA.

Tabla II. Formulación y composición química proximal esperada de las dietas experimentales.

Ingredientes (g 100 g⁻¹)	Dieta ARA Bajo	Dieta ARA Alto
Harina integral trigo (HIT0607) ¹	40.21	40.21
Harina de pescado (HP0607-1) ¹	28.00	28.00
Pasta de soya (Psoy0607-1) ¹	20.00	20.00
Ácido alginico (Sigma A-7128) ²	2.00	2.00
Premezcla de vitaminas (VITCRU0704) ³	1.80	1.80
Lecitina de soya (Isoy0607) ⁴	1.50	1.50
Fosfato dibásico de sodio (SIGMA-S-0876) ²	1.20	1.20
Premezcla de minerales (MINCRUS0704) ²	0.50	0.50
Colesterol (SIGMA-C-8503) ²	0.50	0.50
Cloruro de colina (ICN 101386) ³	0.20	0.20
Vitamina C (Stay-C 35% aa) ⁵	0.09	0.09
Emulsión-mezcla ICES 0/-/C, 30/0.6/C ⁶	4.00	---
Emulsión-mezcla ICES 30/0.6/C, ARA ⁶	---	4.00
BHT (<2004 ICN101162) ³	0.004	0.004
Nutrientes (g 100 g⁻¹ de materia seca)		
Proteína cruda	34.03	34.03
Extracto etéreo	8.13	8.43
Fibra cruda	2.46	2.46
Cenizas	8.19	8.19
Extracto libre de nitrógeno	39.98	39.98
Energía bruta (Cal g ⁻¹)	3866	3893
ARA	0.03	0.17
EPA	0.40	0.40
DHA	0.55	0.55

¹Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V. Guadalajara, México; ²Sigma, St. Louis, MO, USA; ³ICN Biomedicals Inc., OH, USA; ⁴Productos Realeza S. de R.L. de C.V. México D.F.; ⁵(L-ascobil-2-polifosfato 35% actividad C), Roche Vitamins Inc., Parsippany, Nj, USA; ⁶Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Gent, Bélgica.

6.1.2. Fabricación

La fabricación se llevó a cabo en la Planta de Alimentos del CIBNOR, según el método descrito por Civera y Guillaume (1989). En base a las formulaciones previamente descritas, se realizó el cernido usando un tamiz de 250 micras de los ingredientes sólidos que habían sido previamente pulverizados en un molino. Posteriormente, los microingredientes, que estaban compuestos por fosfato dibásico de sodio, cloruro de colina, premezcla de vitaminas y minerales, vitamina C, colesterol y ácido alginico, se mezclaron en una batidora por separado de los macroingredientes (harina de sardina, harina de trigo y pasta de soya) durante 10 minutos. A continuación los microingredientes secos, se adicionaron a los macroingredientes para su completa homogenización durante 10 minutos. Después de obtener la mezcla de los macro- y microingredientes se agregaron las emulsiones que fueron previamente preparadas con una mezcla de lecitina de soya, BHT como antioxidante y las emulsiones ICES. Las emulsiones se adicionaron directamente a la mezcla antes de la peletización en el molino de carne, ya que se ha observado que de esta manera se tienen menores pérdidas de ácidos grasos polinsaturados (comunicación personal, E. Palacios). Después de mezclar aproximadamente 5 minutos y obtener una masa uniforme, se agregó agua al 30% del peso de la masa, y se dejó mezclar nuevamente durante 5 minutos. Una vez obtenida la masa, se extruyó 2 veces en un molino de carne (TOR-REY de ¼ HP, Monterrey, N.L., México) que tenía un dado de 2 mm de diámetro para obtener pelets que fueron cortados a mano (longitud de 0.5 a 1 cm) y colocados en una estufa con ventilación a 35°C. Después de 24 horas de secado se procedió a monitorear la humedad en una termobalanza hasta llegar a una humedad menor al 10%. Posteriormente los alimentos

fueron pesados, empacados en bolsas de plástico, etiquetados y conservados a -20°C hasta su utilización.

6.1.3. Composición química proximal

Se analizó la composición química proximal de los alimentos por triplicado, de acuerdo a los métodos de la A.O.A.C. (1995). Se determinaron los contenidos de humedad (diferencia de peso, estufa a 70°C durante 24 hrs), proteína cruda por microkjeldahl ($\% \text{ N} \times 6.25$), extracto etéreo (Soxtec-Avanti, TECATOR), fibra cruda (hidrólisis sucesiva ácido/base), cenizas (diferencia de peso, calcinación a 500°C durante 24 hrs) y energía (determinación por calorímetro adiabático). El extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó según Tacon (1990):

$$\text{ELN} = 100 - (\% \text{ de proteína} + \% \text{ de extracto etéreo} + \% \text{ de ceniza} + \% \text{ de fibra cruda})$$

La composición proximal y de energía de los alimentos experimentales se muestran en la tabla III, donde se observa que estas fueron similares entre los alimentos experimentales.

Tabla III. Composición química proximal y de energía bruta de los alimentos con contenido bajo y alto de ARA.

(g/100 g de materia seca, excepto humedad)	ARA bajo	ARA alto
Humedad (%)	8.20 ± 0.07	6.75 ± 0.01
Proteína (%)	35.19 ± 0.21	35.32 ± 0.12
Extracto etéreo (%)	8.45 ± 0.20	8.94 ± 1.30
Fibra Cruda (%)	0.88 ± 0.15	0.79 ± 0.16
Cenizas (%)	8.76 ± 0.01	8.82 ± 0.01
Extracto libre de nitrógeno (%)	46.71	46.13
Energía bruta (cal g⁻¹)	4436 ± 33	4416 ± 33

Los ácidos grasos en los alimentos se analizaron como se describe en Arjona y Palacios (2009) y los resultados de lo análisis de ácidos grasos se muestran en la tabla IV. Se observa que hubo diferencias de ácidos grasos entre las dos dietas, con un promedio de ARA de 0.8% ($86.2 \pm 5.4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) en la dieta “ARA bajo” y 3.2% ($323.4 \pm 27.7 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) de ARA en la dieta “ARA alto”.

Tabla IV. Principales ácidos grasos de las dietas experimentales con un contenido bajo y alto de ácido araquidónico.

	ARA bajo (n = 3)	ARA alto (n = 3)
Ácidos grasos		
14:0	4.91 ± 0.09	1.78 ± 0.28
16:0	18.61 ± 0.04	18.30 ± 0.55
18:0	4.13 ± 0.02	3.03 ± 2.14
16:1n-7	2.79 ± 0.32	2.57 ± 0.43
18:1n-9	12.18 ± 0.23	11.71 ± 1.11
18:1n-7	2.11 ± 0.04	2.37 ± 0.54
20:1n-11	0.93 ± 0.31	1.02 ± 0.17
18:2n-6	27.67 ± 0.24	28.97 ± 1.50
18:3n-3	3.53 ± 0.15	3.88 ± 0.29
20:4n-6	0.76 ± 0.08	3.24 ± 0.61
20:5n-3	8.53 ± 0.37	8.41 ± 0.45
22:6n-3	13.84 ± 0.33	14.72 ± 1.55
Σ SAT	27.65 ± 0.11	23.11 ± 1.75
Σ MUFA	18.02 ± 0.27	17.67 ± 0.67
Σ PUFA	54.32 ± 0.34	59.22 ± 2.15
Σ HUFA	23.13 ± 0.38	26.37 ± 0.99

Σ SAT = Suma de ácidos grasos saturados; Σ MUFA = Suma de ácidos grasos monoinsaturados; Σ PUFA = Suma de ácidos grasos poliinsaturados; Σ HUFA = Suma de ácidos grasos altamente insaturados (≥ cuatro doble enlaces).

6.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron juveniles de *Litopenaeus vannamei* con un peso promedio inicial de 3.5 ± 0.1 g obtenidos de los estanques supralitorales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Los organismos fueron aclimatados al sistema de cultivo en el laboratorio de Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos (CIBNOR) dentro de 16 tanques de concreto de 1.48 m^2 ($1.33 \text{ m} \times 1.11 \text{ m}$, Fig. 5). Cada tanque estaba dividido a la mitad por una malla y se colocaron 12 y 50 camarones a cada lado (0.74 m^2) para obtener densidades de cultivo de 16 y 68 organismos por m^2 . Las unidades experimentales fueron cubiertas en su parte superior completamente por una red para evitar que los organismos se escaparan, y en tres cuartas partes con plástico negro para reducir la iluminación y disminuir en lo posible la proliferación de fitoplancton. Se utilizó fotoperiodo natural y aireación constante. La temperatura se mantuvo en $26 \pm 0.8^\circ \text{C}$, la salinidad en 38 ± 1 ups y se realizaron recambios de agua del 40 % diario, reponiendo el volumen perdido por el sifoneo. El alimento se suministró a saciedad aparente, dos veces al día (10:00 am y 6:00 pm), iniciando con el 5% de la biomasa en cada unidad experimental. Los tanques se sifonearon cada 24 horas para eliminar heces, coleccionar mudas y alimento no consumido. Los restos de alimento fueron cuantificados para ajustar la ración alimenticia diariamente. Durante el tiempo de aclimatación (5 días), se les suministró la dieta comercial que recibían en los estanques supralitorales (35% de proteína, PIASA, La Paz, México). Posteriormente se inició la alimentación con las dietas experimentales.



Figura 5. Sistema experimental en el laboratorio de Biología Reproductiva de Organismos Acuáticos.

6.2.1. PRIMER EXPERIMENTO: (ESTRÉS FÍSICO)

Después de la aclimatación, se procedió a la alimentación con las dietas experimentales con alto y bajo nivel de ARA. La temperatura se mantuvo a $26 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ y la salinidad a 38 ± 1 ups. En este experimento denominado estrés físico, se utilizaron 8 tanques a los cuales se asignaron bajas y altas densidades para cada unidad experimental (16 y 68 org/m^2), con la finalidad de obtener la misma calidad de agua para ambos grupos y observar solo el estrés causado por el hacinamiento: interferencia física/mecánica, competencia por los recursos, etc. (Fig. 6). Diariamente por la mañana (antes del recambio, 9:00 am) y por la tarde (5:00 pm), fueron monitoreados el oxígeno disuelto y la temperatura. Dos veces por semana se tomaron muestras de agua de cada tanque para determinar amonio total. Los organismos

que se encontraban muertos fueron sustituidos por organismos marcados del mismo peso, para mantener la misma densidad de cultivo durante todo el experimento. El marcaje se realizó por ablación del pedúnculo ocular: los organismos marcados no fueron muestreados al final del experimento. El experimento duró 30 días y se procedió a la toma de muestras para los diferentes análisis después de un periodo de ayuno de 24 horas.

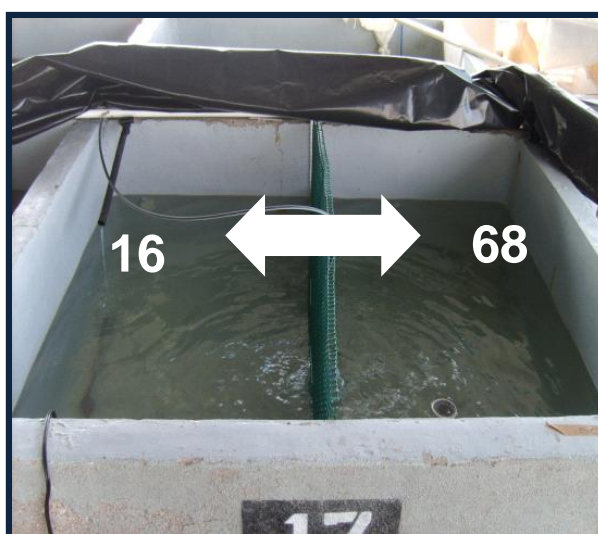


Figura 6. Distribución de los organismos en las unidades experimentales en el experimento de estrés físico. Las flechas indican intercambio de agua en las unidades experimentales y los números, la densidad de cultivo.

6.2.2. SEGUNDO EXPERIMENTO: (ESTRÉS FÍSICO-QUÍMICO)

El segundo experimento denominado estrés físico-químico se realizó al mismo tiempo que el primero, bajo las mismas condiciones generales, pero la distribución de los organismos en los tanques fue distinta. En este se usaron tanques separados para ambas densidades, 4 tanques con 16 y 16 organismos por m^2 en cada mitad, un total de 8 réplicas (denominados

baja densidad) y 4 tanques con 68 y 68 organismos por m² en cada mitad, un total de 8 réplicas (denominados alta densidad, figura 7). El objetivo era observar el estrés causado por las deficiencias en la calidad de agua (concentración de oxígeno disuelto, amonio), además del estrés causado por la interacción de los organismos. El muestreo de los organismos se realizó después de 30 días bajo las condiciones descritas en el experimento anterior, considerando un periodo de ayuno de 24 horas.

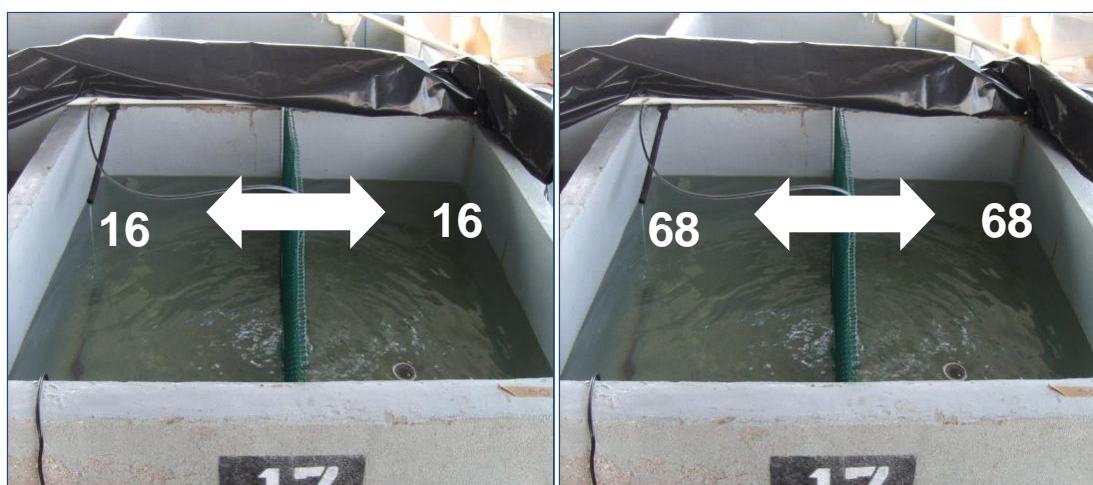


Figura 7. Distribución de los organismos en las unidades experimentales en el experimento 2, de estrés físico-químico. Las flechas indican intercambio de agua en las unidades experimentales y los números, la densidad de cultivo.

6.3. MUESTREO

6.3.1. Variables metabólicas en hemolinfa

Para medir las variables metabólicas, se extrajeron aproximadamente 200 μL de hemolinfa a partir de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal de los organismos con una jeringa de 1 mL con aguja de 27G x 13 mm, que fue previamente lavada con anticoagulante, el cual contenía 5% de oxalato de sodio disuelto en solución isotónica de crustáceos (SIC: 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.3), según (Mendoza, 1992). La hemolinfa extraída se colocó en tubos de vidrio que posteriormente se centrifugaron (Centrífuga refrigerada Allegra 21R, Beckman, Fullerton, CA, USA) a 800 g durante 5 minutos a una temperatura de 4°C para separar el plasma y precipitar los hemocitos. El plasma fue conservado a -70°C en tubos Eppendorf para posteriores análisis. La hemocianina y proteínas totales en la hemolinfa se analizaron el mismo día del muestreo. La concentración de glucosa, lactato y triacilglicéridos se analizaron posteriormente como se describe en la sección 6.4.3 de análisis.

6.3.2. Ácidos grasos en hemocitos

El pelet de hemocitos fue transferido a viales de vidrio de 4 mL usando una pipeta Pasteur. A estos viales se les agregó 3 mL de una solución de cloroformo:metanol (2:1) (Arjona y Palacios, 2009) y 10 μL de estándar interno (ácido graso 23:0) y 10 μL del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT). Para cada vial se transfirieron los hemocitos de 3 organismos, y estos fueron guardados a -20°C para su posterior análisis, como se describe en la sección 6.4.6 de análisis. De esta manera, cada muestra utilizada para el análisis de ácidos grasos constituye un pool de 3 organismos.

6.3.3. Estadio de muda

Después de extraer la hemolinfa, se determinó el peso y la longitud de cada organismo mediante una balanza digital y una regla, respectivamente. El exceso de agua fue eliminado con una toalla de papel. Una vez pesados y medidos, se procedió a cortar los urópodos para identificar el estadio de muda a través de la observación directa del crecimiento de setas con un microscopio óptico (Robertson *et al.*, 1987) y se usaron para el análisis solo los organismos que estuvieran en intermuda.

6.3.4. Variables metabólicas en tejidos

El resto del organismo se colocó en una bolsa, se etiquetó, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C para posteriores análisis bioquímicos, como se describe en la sección de análisis. Para las determinaciones en tejidos, se extrajeron 0.2 g de músculo del primer segmento abdominal y 0.1 g de hepatopáncreas usando una placa de metal fría para la disección. Los tejidos se liofilizaron durante 24 horas, se pesaron y homogeneizaron en 1.0 mL para músculo y 0.5 mL para hepatopáncreas, de solución isotónica para crustáceos. En hepatopáncreas se determinaron las concentraciones de lípidos totales, proteínas totales, triacilglicéridos, lactato y glucógeno, y en músculo, se determinaron las concentraciones totales de lactato, proteínas y glucógeno, como se describe en la sección 6.4.4 de análisis.

6.3.5. Capacidad osmorreguladora y tiempo de coagulación

Para determinar la presión osmótica se usaron organismos distintos a los que se usaron para las variables metabólicas. Se extrajeron 10 μL de hemolinfa de cada organismo a partir de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal, con la ayuda de una micropipeta.

La presión osmótica se midió usando un osmómetro de presión de vapor (Wescor modelo 5520, Logan, UT, USA), para determinar la capacidad osmorreguladora (Charmantier *et al.*, 1994; Hurtado *et al.*, 2006). El tiempo de coagulación fue determinado usando un tubo capilar (diámetro interior: 1.1–1.2 mm; longitud: 75 mm; Corning, Garner, NC, USA), el que se invirtió verticalmente varias veces hasta el momento que se observó la coagulación de la hemolinfa. El tiempo fue registrado con un cronómetro a partir del momento que se extrajo la hemolinfa del camarón hasta que ésta dejó de fluir en el tubo capilar, tal como se describe en la sección 6.4.5 de análisis.

6.3.6. Variables inmunes

Para medir la respuesta inmune se usaron organismos distintos a los usados para las variables metabólicas y la capacidad osmorreguladora. Se les extrajeron aproximadamente 200 μL de hemolinfa a partir de los sacos hemolinfáticos ventrales de los organismos, con jeringas que contenían 400 μL de solución anticoagulante preparada con EDTA (Vargas-Albores *et al.*, 1993) y se cuantificó la producción de anión superóxido (ver sección 6.4.5 de análisis). Se realizó el conteo total de hemocitos, diluyendo 100 μL de hemolinfa con 400 μL de anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993) con formol al 4% y el conteo fue realizado por duplicado utilizando una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) y un microscopio óptico.

6.3.7. Prostaglandina E₂

Para cuantificar la PGE₂ se extrajeron de organismos distintos a los utilizados para las pruebas anteriores, aproximadamente 250 μL de hemolinfa a partir de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal con una jeringa enjuagada en anticoagulante que

contenía 5% de oxalato de sodio disuelto en una solución isotónica de crustáceos SIC (Mendoza, 1992). La hemolinfa se colocó en tubos Eppendorf para su almacenamiento a -70°C y posterior análisis, como se describe en la sección 6.4.7 de análisis.

6.4. ANÁLISIS

6.4.1. Determinación de amonio

Las soluciones utilizadas se prepararon de la siguiente forma:

Solución alcalina: 15 gramos de citrato de sodio + 0.75 de hidróxido de sodio en 100 mL de H_2O .

Solución Fenol (solución A): 10 gramos de fenol en 100 mL de etanol al 95%.

Nitroprusiato (solución B): 0.5 gramos de Nitroprusiato de sodio en 100 mL de H_2O .

Mezcla oxidante al 150 % (solución C): 10 mL de solución alcalina + 2.5 mL de hipoclorito de sodio comercial

La solución estándar de amonio se preparó con 0.382 g de NH_4Cl y se aforó a 1000 mL con agua desionizada para crear una solución de 0.1 mg mL^{-1} (100 mg L^{-1}). Con esta solución se preparó una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 mg L^{-1} .

El procedimiento fue el siguiente:

Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos para evitar la interferencia con sólidos. Posteriormente, se colocaron $20 \mu\text{L}$ de Sol. A en los pozos de una microplaca, más $100 \mu\text{L}$

de agua desionizada. Para blancos se colocaron 150 μL de agua desionizada; para la curva, 150 μL de curva tipo amonio, y para las muestras 150 μL de muestra. Posteriormente, se colocaron 20 μL de Sol. B y 30 μL de Solución C. Después, la microplaca se dejó incubar en oscuridad completa durante una hora y finalmente se leyó la absorbancia a 655 nm.

6.4.2. Determinación de ácidos grasos en las dietas

Los ácidos grasos se determinaron como se describe en Arjona y Palacios (2009). Se pesó 1 g de cada una de las dietas experimentales y se colocaron en viales de vidrio con tapa de teflón. Posteriormente se les agregó 6 mL de solución Folch cloroformo:metanol (volumen 2:1) para la extracción de los lípidos, 10 μL de antioxidante (BHT) y 10 μL del estándar interno, el ácido graso 23:0. Después la muestra se guardó a -20°C por 24 horas. Posteriormente, se maceró con una varilla de vidrio y el extracto se sonicó durante 15 minutos (Sonicator BRANSON 2510, Danbury, CT, USA), este se separó en tres partes iguales para guardar una de ellas como respaldo; con otra parte se determinaron los lípidos por gravimetría (resultados no mostrados), y la última parte se evaporó a sequedad con una corriente de nitrógeno. Se derivatizó con trifluoruro de boro (BF_3) a 95°C durante 15 minutos. Después que los tubos se enfriaron, se les añadió 1 mL de hexano y se realizaron 3 lavados, que consistían en agregar 1 mL de agua destilada para eliminar las impurezas y separar la fracción de agua conteniendo las impurezas del hexano con los metilésteres de ácidos grasos. Las muestras fueron centrifugadas en cada lavado a 720 g a 5°C durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada (Allegra 21R, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Los restos de agua se eliminaron por congelación a -20°C y el hexano se transfirió a viales ámbar de 2 mL para ser inyectados en un cromatógrafo de gases (6890N, Agilent Technologies, Shanghai, China). Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención con los de los estándares. La determinación cuantitativa se realizó integrando las áreas de cada ácido graso

6.4.3. Variables metabólicas en hemolinfa

1. Hemocianina

Se diluyó 1:20 la muestra de plasma en solución isotónica para crustáceos (SIC), (Mendoza, 1992). Se leyó la absorbancia de cada muestra usando un espectrofotómetro (UNICO UV-2100) a una longitud de onda de 335 nm (Racotta y Hernández Herrera, 2000). La concentración de hemocianina fue calculada mediante la ecuación:

$$\text{Concentración hemocianina} = (\text{absorbancia} \times \text{factor de dilución} \times 10) / E1\%$$

donde:

- E1% representa el coeficiente de extinción de una solución de hemocianina al 1% y tiene un valor de 2.83 (Hagerman, 1986).
- Factor de dilución: igual a 20
- La multiplicación por 10 se realiza para expresar la concentración en mg mL^{-1} .

2. Proteínas

Esta técnica se basa en el método de Bradford (1976) en la cual los grupos amino de las proteínas reaccionan con el colorante azul de coomassie, ácido fosfórico y metanol. Se

elaboró una curva tipo con albumina sérica bovina como estándar (Sigma, A-3912; St. Louis, MO, USA). Las concentraciones utilizadas para la curva fueron: 0, 0.625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg mL⁻¹. Para el blanco se empleó SIC. El reactivo de Bradford (Bio-Rad, 500-0006; Hercules, CA, USA) se utilizó puro.

El procedimiento fue el siguiente: Las muestras de plasma se diluyeron 1:100 y se colocaron en un pozo de la microplaca 10 µL de muestra más 200 µL del reactivo de Bradford; se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, después de transcurrido el tiempo de reacción, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplaca (Bio-rad, Modelo 680, Hercules, CA, USA). Para la curva tipo se utilizaron 10 µL de cada concentración del estándar.

3. Glucosa

Para la determinación de glucosa se utilizó el kit comercial GOD-PAP (RANDOX Lab, Crumlin, Reino Unido), cuyo principio consiste en la oxidación de la glucosa en presencia de la enzima oxidasa, con la formación de peróxido de hidrógeno. Esta reacciona con fenol y 4 - amino fenazona en presencia de una peroxidasa, dando un colorante rojo violeta de antipirilquinonimina, que es proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra. Se elaboró una curva tipo a partir de una solución estándar cuya concentración era de 100 mg dL⁻¹. Las concentraciones de la curva fueron las siguientes: 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg dL⁻¹. Como blanco se utilizó SIC (Mendoza, 1992).

Se utilizaron 20 µL de plasma sin diluir, estándar o SIC y 200 µl de solución reactiva, se dejaron reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente, después de transcurrido el tiempo de reacción, se leyó absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de

microplaca (Bio-rad, Modelo 680, Hercules, CA, USA).

4. Triglicéridos

Se realizó utilizando el kit comercial GPO-PAP (RANDOX Lab, Crumlin, Reino Unido), donde los triglicéridos son hidrolizados por lipasas hasta glicerol y ácidos libres. El indicador es una quinoneimina formada por peróxido de hidrógeno, 4 - aminofenazona y 4 - clorofenol, bajo la influencia catalítica de peroxidasa. Para este análisis, se elaboró una curva tipo a partir de una solución estándar cuya concentración era de 200 mg dL^{-1} . Las concentraciones de la curva fueron las siguientes: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mg dL^{-1} . Para el blanco se utilizó SIC.

Se utilizaron 20 μL de plasma, estándar o SIC y 200 μl de solución reactiva, se dejaron reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente, después de transcurrido el tiempo de reacción, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplaca (Bio-rad, Modelo 680, Hercules, CA, USA).

5. Lactato

Esta determinación se realizó utilizando el kit comercial GPO-PAP (RANDOX Lab, Crumlin, Reino Unido), cuyo principio es que el lactato es convertido a piruvato con la formación de peróxido de hidrógeno por la enzima lactato oxidasa, el mismo que es oxidado por una peroxidasa, formándose un compuesto colorido. Para este análisis, se elaboró una curva tipo a partir de una solución estándar cuya concentración era de 40 mg dL^{-1} . Las concentraciones de la curva fueron las siguientes: 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg dL^{-1} .

Para el blanco se utilizó SIC (Mendoza, 1992).

Se utilizaron 10 μL de plasma, estándar o SIC y 200 μL de solución reactiva, se dejaron reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente; después de transcurrido el tiempo de reacción se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplaca (Bio-rad, Modelo 680, Hercules, CA, USA).

6.4.4. Variables metabólicas en tejidos

Se extrajeron 0.2 g de músculo del primer segmento abdominal y 0.1 g de hepatopáncreas usando una placa de metal fría para la disección. Los tejidos se liofilizaron durante 24 horas, se pesaron y homogeneizaron en 1.0 mL para músculo y 0.5 mL para hepatopáncreas de solución isotónica para crustáceos. En hepatopáncreas se determinaron las concentraciones de lípidos totales, proteínas totales, triacilglicéridos, lactato y glucógeno y en músculo, se determinaron las concentraciones totales de lactato, proteínas y glucógeno.

1. Proteínas en músculo y hepatopáncreas

Se tomaron 10 μL del homogeneizado de músculo y se le añadió 600 μL NaOH 0.5 N (dilución 1:61). Posteriormente se agitaron en un vórtex y se dejaron reposar por 2 horas a temperatura ambiente. Se recuperaron 10 μL en tubo de vidrio y se agregó 1 mL de reactivo de Bradford para después agitar y dejar reaccionar por 20 minutos, transcurrido el tiempo de reacción, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Para el caso de las muestras de hepatopáncreas se tomaron 10 μL del homogeneizado y 100 μL de NaOH 0.5 N (dilución 1:11) y se procedió de la misma manera que con las muestras de hemolinfa.

2. Lactato en músculo y hepatopáncreas

A diferencia de la hemolinfa, en la curva tipo con las siguientes concentraciones: 0.003, 0.006, 0.012, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg mL⁻¹. Se tomaron 200 µL del homogeneizado de musculo y se le añadió 200 µL de TCA al 20 % (dilución 1:2). Las muestras se centrifugaron a 3600 g por 10 min a 5 °C y se recuperaron 20 µL de sobrenadante que fueron colocados en un pozo de microplaca y se les agregó 200 µL de solución reactiva, se dejó reaccionar por 10 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm, como se describe para hemolinfa.

Para el caso de las muestras de hepatopáncreas se tomaron 100 µl del homogeneizado y 50 µL de TCA al 15% (dilución 1:1.5) y se procedió de la misma manera que con las muestras de tejido muscular.

3. Glucógeno en músculo y hepatopáncreas

Se usó el mismo sobrenadante libre de proteínas (en TCA) que para lactato. Se recuperaron 100 µL de sobrenadante que fueron colocados en tubos de vidrio, se les agregó 2 mL de alcohol frío y se centrifugaron de nuevo a a 3600 g por 10 min a 5 °C. Se descartó el alcohol y evaporaron los restos en una estufa, después se les agregó 100 µL de agua destilada más 1 mL de antrona y se calentó a 85 °C durante 10 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar las muestras en baño de hielo y se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm.

4. Triglicéridos en hepatopáncreas

Se elaboró una curva tipo con las siguientes concentraciones: 0.015, 0.031, 0.062, 0.125,

0.25, 0.5 y 1 mg mL⁻¹. Para las muestras se colocaron en un pozo de la microplaca 20 µL del homogeneizado de hepatopáncreas diluido 1:30 con SIC, más 200 µL de solución reactiva, y se dejaron reaccionar durante 20 minutos a temperatura ambiente, después de transcurrido el tiempo de reacción, la microplaca fue colocada en el lector para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm, como se describe para hemolinfa.

6.4.5. Variables inmunes

1. Determinación de la producción de anión superóxido

La producción de anión superóxido fue cuantificada por espectrofotometría después de la reducción del nitroblue tetrazolium (NBT) en formazan de color azul (Song y Hsieh, 1994). Se colocaron 100 µL de hemolinfa en dos series de tubos Eppendorf estériles por triplicado y se centrifugaron a 800 g por 8 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado sin tocar el pellet y se agregaron 100 µL de anticoagulante a cada tubo para ser centrifugados de nuevo bajo las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. Las dos series de tubos fueron utilizados para medir la producción de anión superóxido tanto basal como en hemocitos activados. Para la serie de los hemocitos activados, se les adicionó a los tubos 50 µL de laminarina (Sigma, L-9634; 2 mg mL⁻¹; St. Louis, MO, USA) y 50 µL de NBT (Sigma, N-6876; 0.3% en HBSS; St. Louis, MO, USA) diluidos en una solución de Hank. Para la serie de producción basal, se le agregó a cada tubo 50 µL de HBSS en vez de laminarina. A partir de este momento se les dio el mismo tratamiento a las dos series. Todos los tubos se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C; transcurrido el tiempo de reacción se centrifugaron a 800 g durante 8 minutos a 4°C y la laminarina y el NBT fueron desechados. Posteriormente, se agregaron 100 µL de metanol absoluto, se centrifugaron y nuevamente

fueron lavados con metanol al 70% para después sacarlos con aire caliente. El formazan citoplásmico se disolvió adicionando 120 μL de KOH (2M) y 140 μL de sulfóxido de dimetilo. Finalmente, las muestras fueron leídas a 650 nm en un lector de microplacas (BIORAD, Modelo 550; Hercules, CA, USA).

6.4.6. Análisis de ácidos grasos en hemocitos

Cada muestra conformada por un “pool” de pelets de hemocitos obtenida a partir de 3 organismos fue macerada con una varilla de vidrio. El extracto fue evaporado con nitrógeno hasta obtener 0.5 mL y se pasó a través de una microcolumna fabricada a partir de una pipeta Pasteur empaquetada con sílice humedecido al 6%. Posteriormente, se usaron 10 mL de cloroformo: metanol (98:2 v/v) para eluir los lípidos neutros en un primer tubo y los lípidos polares fueron eluidos en otro tubo con 15 mL de metanol. A los lípidos polares se les agregó 10 μL del ácido graso 23:0 y 10 μL del antioxidante BHT. Las fracciones neutras y polares obtenidas fueron evaporadas a sequedad en un evaporador centrífugo al vacío (JOUAN RCT90, Saint-Herblain, Francia) y enseguida fueron derivatizadas con BF_3 a 85°C durante 15 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente; una vez enfriados se les añadió 1 mL de hexano y se realizaron de 2 a 3 lavados adicionando 1 mL de agua destilada. Las muestras se centrifugaron a 720 g a 5°C por 5 minutos (Centrífuga refrigerada, Allegra 21R, Beckman) a cada lavado. Después se guardaron a -20°C para eliminar los restos de agua, extraer solo el hexano y transferirlo a viales ámbar de 2 mL. Se inyectaron 5 μL de cada muestra en un cromatógrafo de gases (G890N, Agilent Technologies, Shangai, China). El cromatógrafo estaba equipado de una columna de sílice DB-23 (30 m \times 0.25 mm de diámetro interno \times 0.25 μm de grosor de

capa), un detector de ionización de flama con helio como gas portador (0.7 mL min^{-1}). Los ácidos grasos fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los de estándares (Sigma, Bellefonte, PA, USA) y la proporción de cada ácido graso se calculó en relación al total (Arjona y Palacios, 2009).

6.4.7. Determinación de PGE₂

Se procedió a la purificación de las muestras de hemolinfa contenidas en tubos eppendorf. Estas fueron centrifugadas a 800 g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C . Se separó el plasma de los hemocitos y se les agregó 2 mL y 3 mL de etanol respectivamente. A continuación, los hemocitos fueron sonicados durante 5 minutos. El total de las muestras (hemocitos y plasma) se dejó incubar a 4°C por 5 minutos para después centrifugarse a $3,000 \text{ g}$ durante 10 minutos. A partir de este momento se realizó la purificación de la muestra descrita en Reza (2009) y la determinación de la PGE₂ mediante el kit EIA (Cayman chemicals, Ann Arbor, MI, USA)

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables fisicoquímicas (temperatura, oxígeno disuelto, amonio) se analizaron con un análisis de varianza unifactorial, tomando la densidad entre los experimentos físico y fisicoquímico como variable independiente (con tres niveles: 16-16, 16-68 y 68-68 org m^{-2}).

Para analizar diferencias entre las distintas condiciones experimentales para las variables metabólicas, inmunes y morfométricas en camarones, se realizaron análisis de varianza de

dos vías tomando como primera variable independiente los niveles de ARA en la dieta (con dos niveles: bajo y alto) y como segunda variable independiente la densidad (con dos niveles: 16 y 68 org m⁻²). Se verificó anticipadamente la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk). Si los datos no cumplían con las condiciones anteriores, se utilizaba una transformación matemática (Sokal y Rohlf, 1995). En los casos donde se obtuvieron valores significativos de interacción en los factores, se procedió a la comparación de medias individuales mediante pruebas a posteriori de Tukey, que se muestran con letras en las tablas y figuras de lo contrario solo se indica el promedio global por efecto significativo ya sea de la dieta independientemente de la densidad o de la densidad independientemente de la dieta. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. Los análisis estadísticos se consideraron significativamente diferentes cuando P era menor a 0.05 ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos fueron analizados por separado para el experimento físico y fisicoquímico.

VII. RESULTADOS

7.1. Comparación de variables fisicoquímicas entre los dos experimentos

Los resultados del promedio de temperatura se muestran en la figura 8; la temperatura no fue significativamente diferente entre las unidades experimentales del experimento físico $25.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ y el experimento fisicoquímico $26.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

El promedio de la concentración de oxígeno disuelto fue significativamente afectada por la densidad de cultivo (Fig. 9); la mayor concentración fue registrada para los tanques con baja densidad ($5.5 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$), y la menor para los tanques con alta densidad ($3.7 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$), ambos del experimento fisicoquímico. La concentración de oxígeno en los tanques del experimento físico fue intermedia en comparación con los valores para las dos densidades anteriores ($4.7 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$).

La concentración de amonio en el agua se muestra en la Fig. 10. El amonio incrementó en la segunda y última semana en los tanques del experimento fisicoquímico, registrándose el valor más alto en los tanques de alta densidad ($2.4 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$). Los valores totales promedio fueron $1.4 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ para los tanques de alta densidad y $0.3 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ para los de baja densidad en el experimento fisicoquímico y $0.6 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ para los tanques del experimento físico.

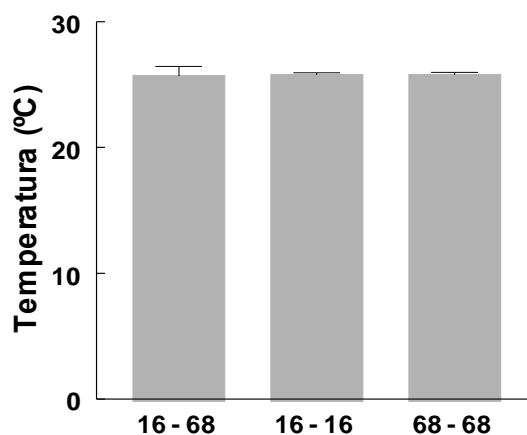


Figura 8. Temperatura (°C) promedio en los tanques durante la realización de los experimentos físico (16-68 org m⁻²) y físico-químico (16-16 y 68-68 org m⁻²).

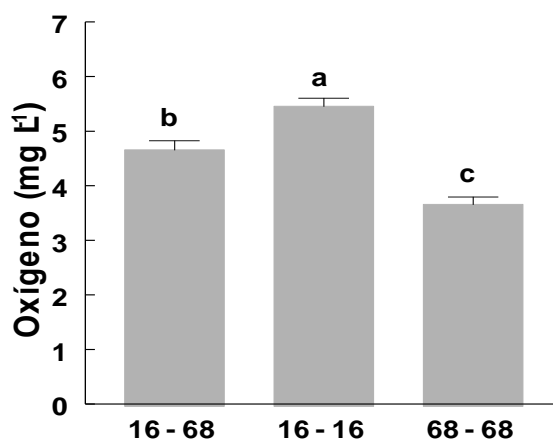


Figura 9. Oxígeno disuelto (mg L⁻¹) promedio en los tanques durante la realización de los experimentos físico (16-68 org m⁻²) y físico-químico (16-16 y 68-68 org m⁻²).

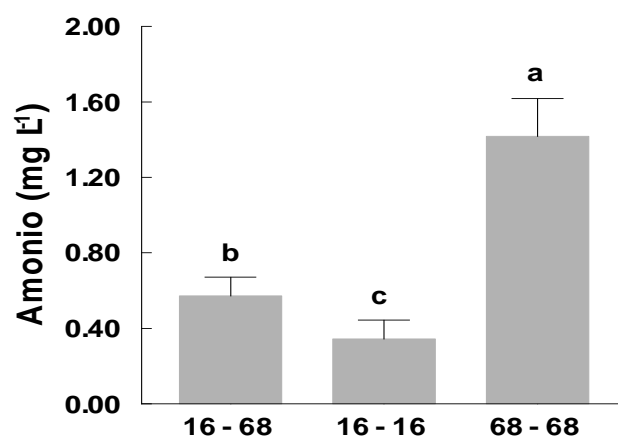


Figura 10. Concentración de amonio (mg L^{-1}) promedio en los tanques durante la realización de los experimentos físico ($16-68 \text{ org m}^{-2}$) y físico-químico ($16-16$ y $68-68 \text{ org m}^{-2}$).

7.2. ESTRÉS FÍSICO

7.2.1 Desempeño biológico

El peso inicial de los organismos no fue significativamente diferente entre los tratamientos experimentales, sin embargo, después de 30 días de experimentación, los camarones sometidos a una alta densidad de cultivo mostraron un peso final significativamente menor (promedio global: 9.4 ± 0.1 g) que los camarones cultivados a baja densidad (promedio global: 10.1 ± 0.1 g). No se observó efecto significativo en relación a los niveles de ARA en la dieta. (Figura 11).

La ganancia en peso (expresada como porcentaje del peso inicial) fue mayor en los organismos a baja densidad (promedio global: 289.7 ± 4.0 %) comparados con los organismos a alta densidad (promedio global: 271.6 ± 3.8 %) (Fig. 12). No se observó efecto significativo en relación a los niveles de ARA en la dieta.

La longitud final fue afectada significativamente por la densidad de cultivo pero además y tal como lo muestra la interacción, esta fue menor en los organismos a alta densidad y alimentados con una dieta rica en ARA en comparación con los organismos a baja densidad y alimentados con la misma dieta (Fig. 13).

El consumo de alimento fue afectado significativamente por la densidad de cultivo, siendo mayor en los organismos mantenidos a una alta densidad de cultivo (promedio global: 0.32 ± 0.01 g), comparado con los organismos mantenidos a baja densidad (promedio global: 0.26 ± 0.01 g) (Fig. 15). No se observó efecto significativo en relación a los niveles de ARA en la dieta. El número de mudas por organismo fue afectado directamente por la

densidad de cultivo, siendo mayor para los organismos mantenidos a baja densidad (Fig. 14). La sobrevivencia no fue afectada por la dieta, ni por la densidad de cultivo.

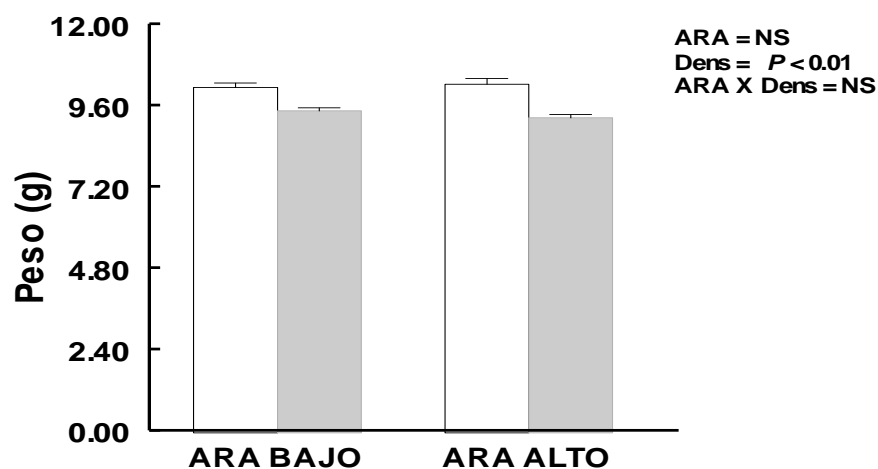


Figura 11. Peso final (promedio \pm error estándar) de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* mantenidos a bajas (barra blanca) y altas (barra gris) densidades de cultivo (16 y 68 org m⁻² respectivamente) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

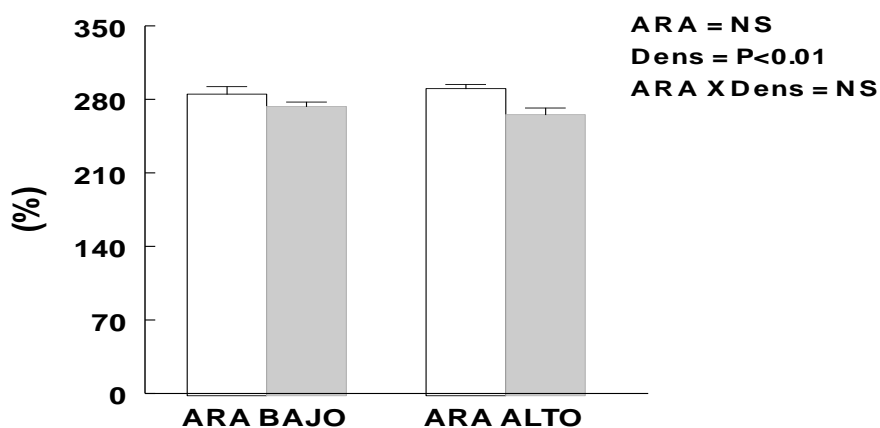


Figura 12. Ganancia en peso (%) (promedio \pm error estándar) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²), alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

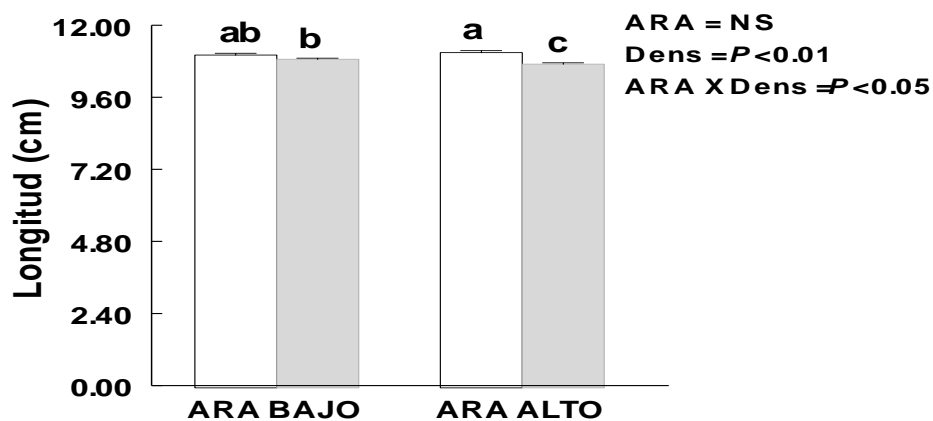


Figura 13. Longitud final (cm) (promedio \pm error estándar) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²), alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

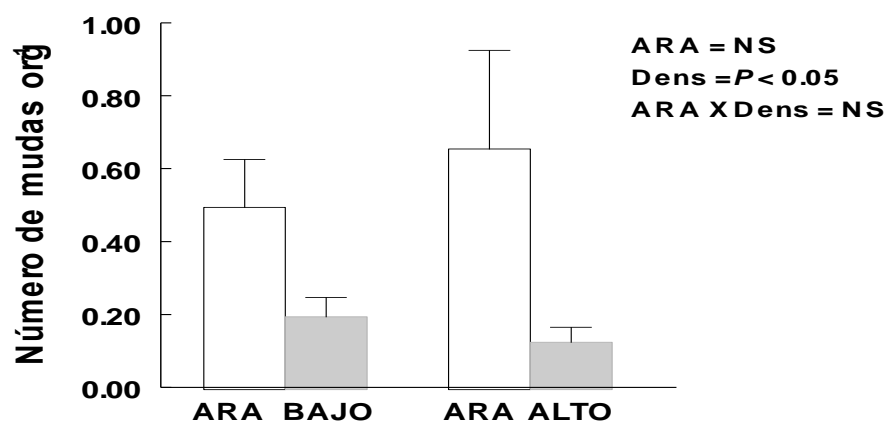


Figura 14. Número de mudas por organismo durante los 30 días de bioensayos (promedio \pm error estándar) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²), alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

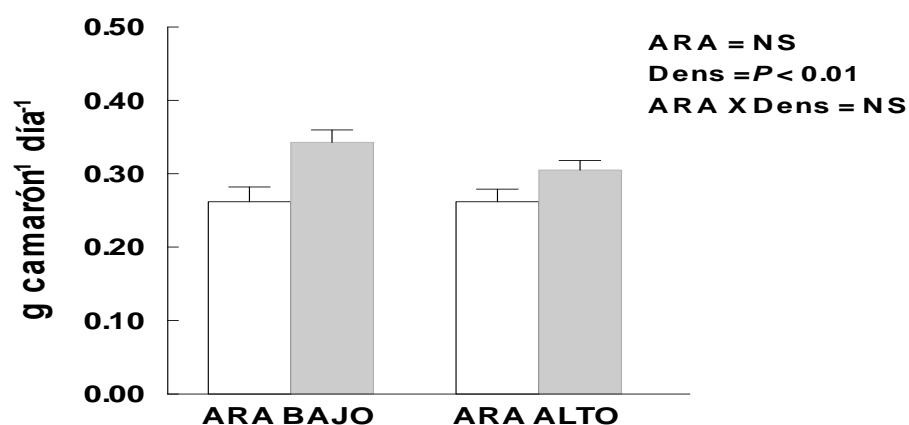


Figura 15. Consumo de alimento (promedio \pm error estándar) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²), alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

7.2.2. Variables metabólicas

La concentración de glucosa en hemolinfa fue afectada por el nivel de ARA en la dieta, con valores más altos cuando se alimentó a los camarones con la dieta con un nivel bajo de ARA (promedio global: $16.4 \pm 2.0 \text{ mg dL}^{-1}$), comparado con los camarones alimentados con la dieta con un nivel alto de ARA (promedio global: $11.8 \pm 1.4 \text{ mg dL}^{-1}$).

La concentración de lactato en hemolinfa fue significativamente mayor para los organismos mantenidos a una densidad baja de cultivo y alimentados con la dieta baja en ARA (27 vs 17 mg dL⁻¹ ARA bajo y ARA alto respectivamente).

No se observaron diferencias significativas para proteínas totales, hemocianina, triacilglicéridos ni presión osmótica en hemolinfa en ninguna de las condiciones experimentales (Tabla V).

En hepatopáncreas, la concentración de lactato fue significativamente diferente en organismos en relación a la densidad de cultivo, con valores mayores en organismos cultivados a baja densidad (promedios globales: $0.9 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$ vs $0.6 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$). No se observó efecto significativo para lactato en relación a los niveles de ARA en la dieta. La concentración de las variables restantes en este tejido no fueron significativamente afectadas por los niveles de ARA en la dieta, ni por la densidad de cultivo (Tabla V).

En músculo, se observó una interacción significativa para la concentración de glucógeno, que indica que esta reserva es menor en organismos a alta densidad solo si son alimentados con la dieta alta en ARA (Tabla V). No se observaron diferencias significativas para el resto de las variables metabólicas en músculo.

Tabla V. Variables metabólicas (promedio \pm error estándar) medidas en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo de juveniles de *Litopenaeus vannamei* de camarones alimentados con dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo. Las tres últimas columnas muestran los resultados de los ANOVAs: Dens = Densidad; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	ARA bajo		ARA alto		ARA	Dens	ARA x Dens
	16 org	68 org	16 org	68 org			
Hemolinfa (n=23)							
	n=6	n=8	n=6	n=3			
Proteínas totales (mg ml ⁻¹)	169.3 \pm 4.1	145.9 \pm 9.1	168.4 \pm 5.6	163.5 \pm 13.5	NS	NS	NS
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	80.9 \pm 4.3	68.1 \pm 3.1	78.4 \pm 4.6	74.4 \pm 9.0	NS	NS	NS
Glucosa (mg dl ⁻¹)	13.9 \pm 1.3	19.1 \pm 3.6	12.8 \pm 1.8	9.2 \pm 0.2	*	NS	NS
Lactato (mg dl ⁻¹)	31.3 \pm 2.3	22.7 \pm 2.3	18.4 \pm 2.0	16.2 \pm 2.0	**	*	NS
Triacilglicéridos (mg dl ⁻¹)	84.8 \pm 7.4	68.4 \pm 4.8	80.5 \pm 6.6	73.5 \pm 8.3	NS	NS	NS
Presión osmótica (mOsm kg ⁻¹)	758.8 \pm 12.8	763.0 \pm 13.3	729.3 \pm 13.2	755.5 \pm 9.0	NS	NS	NS
Hepatopáncreas (n=48)							
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	76.5 \pm 3.3	84.3 \pm 6.6	76.6 \pm 6.0	75.4 \pm 5.3	NS	NS	NS
Glucógeno (mg g ⁻¹)	8.0 \pm 0.7	8.0 \pm 0.6	8.2 \pm 0.6	8.6 \pm 0.6	NS	NS	NS
Lactato (mg g ⁻¹)	1.0 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	NS	*	NS
Triacilglicéridos (mg g ⁻¹)	244.1 \pm 33.5	254.6 \pm 26.8	281.9 \pm 39.0	267.5 \pm 24.8	NS	NS	NS
Músculo							
Proteínas totales (mg g ⁻¹) n=48	867.2 \pm 76.9	652.8 \pm 42.6	810.4 \pm 82.1	801.4 \pm 64.6	NS	NS	NS
Glucógeno (mg g ⁻¹) n=47	5.8 \pm 0.7a	3.3 \pm 0.6b	5.2 \pm 0.7ab	5.3 \pm 0.5ab	NS	NS	*
Lactato (mg g ⁻¹) n=46	3.4 \pm 0.4	3.6 \pm 0.2	3.6 \pm 0.4	3.0 \pm 0.3	NS	NS	NS

7.2.3. Ácidos grasos en hemocitos

Los resultados de la composición (%) de ácidos grasos en los lípidos de reserva de los hemocitos para el experimento físico se muestran en la Tabla VI. Los camarones alimentados con la dieta que contiene un nivel alto de ARA mostraron una proporción significativamente mayor de este ácido graso en los lípidos de reserva de los hemocitos, en comparación con los camarones alimentados con la dieta que contenía un nivel bajo de ARA (promedios globales: 13.1 ± 1.6 vs 8.0 ± 1.4). También se observó un efecto significativo de la dieta sobre los niveles de los ácidos grasos saturados 14:0 y 22:0 con niveles menores para la dieta alta en ARA. Sin embargo, para el 22:0 también se obtuvo una interacción significativa, que indica que los valores más altos se obtuvieron en organismos alimentados con ARA bajo y cultivados a densidades altas.

En los fosfolípidos de los hemocitos, se observó un efecto por niveles de ARA en el 16:0, 24:0 y una tendencia para el 20:4n-6 (Tabla VII). No se observó efecto por densidad o por interacción.

Tabla VI. Principales ácidos grasos (% , promedio \pm error estándar) en los lípidos de reserva de los hemocitos de camarones alimentados con dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo. Las tres últimas columnas muestran los resultados de las ANOVAs: Dens = Densidad; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	ARA bajo		ARA alto		ARA	Dens	ARA x Dens
	16 org (n=3)	68 org (n=3)	16 org (n=3)	68 org (n=3)			
Ácidos grasos							
14:0	1.48 \pm 0.36	1.30 \pm 0.12	0.66 \pm 0.05	0.78 \pm 0.16	**	NS	NS
16:0	18.72 \pm 1.50	16.92 \pm 0.79	13.64 \pm 1.79	16.50 \pm 0.59	NS	NS	NS
18:0	16.64 \pm 2.92	12.20 \pm 0.62	11.25 \pm 1.33	14.05 \pm 1.04	NS	NS	NS
22:0	0.41 \pm 0.05	0.76 \pm 0.06	0.49 \pm 0.04	0.33 \pm 0.04	**	NS	NS
24:0	1.01 \pm 0.43	0.57 \pm 0.26	1.22 \pm 1.05	0.30 \pm 0.22	NS	NS	NS
16:1n-9	0.69 \pm 0.10	1.07 \pm 0.22	0.76 \pm 0.15	0.62 \pm 0.10	NS	NS	NS
16:1n-7	0.89 \pm 0.20	1.15 \pm 0.17	0.96 \pm 0.18	1.07 \pm 0.08	NS	NS	NS
18:1n-9	8.31 \pm 1.49	9.61 \pm 1.04	9.00 \pm 1.62	10.24 \pm 0.62	NS	NS	NS
18:1n-7	6.13 \pm 1.54	4.39 \pm 0.57	4.89 \pm 1.56	4.01 \pm 0.59	NS	NS	NS
20:1n-11	4.99 \pm 2.08	2.56 \pm 1.02	3.75 \pm 2.94	1.75 \pm 1.01	NS	NS	NS
22:1n-11	2.62 \pm 1.28	1.27 \pm 0.63	2.68 \pm 2.26	0.88 \pm 0.56	NS	NS	NS
18:2n-6	7.87 \pm 2.34	10.00 \pm 1.21	9.30 \pm 1.64	9.96 \pm 1.02	NS	NS	NS
18:3n-6	0.36 \pm 0.02	0.28 \pm 0.10	0.78 \pm 0.32	0.43 \pm 0.03	NS	NS	NS
18:3n-3	0.61 \pm 0.13	0.73 \pm 0.06	0.75 \pm 0.10	0.72 \pm 0.08	NS	NS	NS
20:2n-6	1.05 \pm 0.19	1.27 \pm 0.11	1.31 \pm 0.19	1.07 \pm 0.10	NS	NS	NS
20:4n-6	8.24 \pm 1.82	7.68 \pm 2.48	15.07 \pm 3.09	11.12 \pm 0.65	*	NS	NS
20:5n-3	10.00 \pm 3.39	14.25 \pm 1.07	9.77 \pm 1.91	11.37 \pm 1.09	NS	NS	NS
22:6n-3	9.98 \pm 3.61	13.97 \pm 1.41	13.73 \pm 2.68	14.80 \pm 2.03	NS	NS	NS
Σ SAT¹	38.26 \pm 4.70	31.75 \pm 0.59	27.26 \pm 2.02	31.96 \pm 2.11	NS	NS	NS
Σ MUFA²	23.64 \pm 3.13	20.05 \pm 1.32	22.03 \pm 5.16	18.57 \pm 1.53	NS	NS	NS
Σ PUFA³	38.10 \pm 7.83	48.18 \pm 1.21	50.70 \pm 3.17	49.47 \pm 3.58	NS	NS	NS
Σ HUFA⁴	28.22 \pm 5.26	35.91 \pm 0.26	38.56 \pm 2.15	37.30 \pm 2.43	NS	NS	NS

¹Suma de los ácidos grasos saturados; ²Suma de los ácidos grasos mono-insaturados; ³Suma de los ácidos grasos poli-insaturados; ⁴Suma de los ácidos grasos altamente insaturados (\geq cuatro doble enlaces)

Tabla VII. Principales ácidos grasos (% promedio \pm error estándar) en los fosfolípidos de los hemocitos de camarones alimentados con dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo. Las tres últimas columnas muestran los resultados de las ANOVAs: Dens = Densidad; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	ARA bajo		ARA alto		ARA	Dens	ARA x Dens
	16 org (n=3)	68 org (n=3)	16 org (n=3)	68 org (n=3)			
Ácidos grasos							
14:0	1.19 \pm 0.29	1.05 \pm 0.24	0.69 \pm 0.12	0.62 \pm 0.16	NS	NS	NS
16:0	17.30 \pm 1.02	17.16 \pm 0.39	13.77 \pm 1.66	15.66 \pm 0.84	*	NS	NS
18:0	15.17 \pm 1.87	12.64 \pm 0.76	12.15 \pm 1.47	14.01 \pm 0.40	NS	NS	NS
22:0	0.31 \pm 0.01	0.38 \pm 0.21	0.56 \pm 0.20	0.28 \pm 0.08	NS	NS	NS
24:0	0.80 \pm 0.39	0.59 \pm 0.26	0.14 \pm 0.05	0.07 \pm 0.03	*	NS	NS
16:1n-9	0.41 \pm 0.08	0.59 \pm 0.27	0.54 \pm 0.15	0.35 \pm 0.12	NS	NS	NS
16:1n-7	0.98 \pm 0.15	1.16 \pm 0.10	0.94 \pm 0.14	1.08 \pm 0.05	NS	NS	NS
18:1n-9	9.80 \pm 1.32	10.88 \pm 0.87	9.50 \pm 1.66	11.33 \pm 0.18	NS	NS	NS
18:1n-7	5.03 \pm 1.01	4.25 \pm 0.15	5.27 \pm 1.70	3.53 \pm 0.10	NS	NS	NS
20:1n-11	3.19 \pm 1.53	1.93 \pm 0.43	4.02 \pm 3.13	1.16 \pm 0.13	NS	NS	NS
22:1n-11	1.56 \pm 0.97	0.76 \pm 0.22	2.83 \pm 2.42	0.32 \pm 0.03	NS	NS	NS
18:2n-6	10.34 \pm 2.07	11.99 \pm 1.10	9.85 \pm 1.77	11.68 \pm 0.43	NS	NS	NS
18:3n-6	0.44 \pm 0.09	0.39 \pm 0.02	0.83 \pm 0.35	0.51 \pm 0.02	NS	NS	NS
18:3n-3	0.73 \pm 0.16	0.81 \pm 0.12	0.80 \pm 0.11	0.86 \pm 0.07	NS	NS	NS
20:2n-6	1.36 \pm 0.18	1.56 \pm 0.15	1.46 \pm 0.19	1.28 \pm 0.04	NS	NS	NS
20:4n-6	6.37 \pm 2.53	5.49 \pm 2.24	13.96 \pm 3.97	8.73 \pm 1.36	0.08	NS	NS
20:5n-3	10.45 \pm 1.94	12.21 \pm 0.14	9.11 \pm 1.81	11.31 \pm 0.81	NS	NS	NS
22:6n-3	14.56 \pm 3.75	16.18 \pm 2.22	13.56 \pm 3.39	17.24 \pm 1.61	NS	NS	NS
Σ SAT¹	34.77 \pm 3.53	31.81 \pm 1.53	27.32 \pm 3.02	30.63 \pm 1.52	NS	NS	NS
Σ MUFA²	20.97 \pm 2.12	19.56 \pm 0.08	23.10 \pm 5.64	17.76 \pm 0.12	NS	NS	NS
Σ PUFA³	44.25 \pm 5.52	48.63 \pm 1.60	49.58 \pm 2.82	51.61 \pm 1.62	NS	NS	NS
Σ HUFA⁴	31.38 \pm 3.16	33.88 \pm 0.65	36.64 \pm 1.63	37.28 \pm 1.13	NS	NS	NS

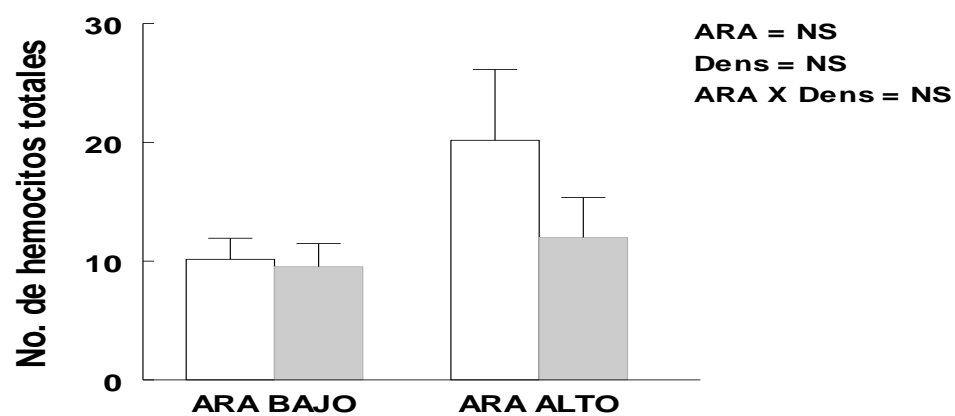
¹Suma de los ácidos grasos saturados; ²Suma de los ácidos grasos mono-insaturados; ³Suma de los ácidos grasos poli-insaturados; ⁴Suma de los ácidos grasos altamente insaturados (\geq cuatro doble enlaces)

7.2.4. Variables inmunes

No se observaron diferencias significativas en el conteo total de hemocitos para ninguna de las condiciones experimentales (Fig. 16); aunque el mayor número de hemocitos se obtuvo en los organismos alimentados con el nivel alto de ARA y mantenidos a una baja densidad de cultivo. Si bien no se alcanzó la significancia estadística (efecto densidad $P = 0.054$) los camarones mantenidos a una alta densidad de cultivo mostraron una mayor producción de anión superóxido, la cual fue aún más pronunciada en camarones alimentados con la dieta alta en ARA (Fig. 16).

El tiempo de coagulación de la hemolinfa fue mayor en los camarones mantenidos a una baja densidad de cultivo y en aquellos alimentados con la dieta baja en ARA. No se observó una interacción significativa (Fig. 17).

a) Número de hemocitos totales



b) Anión Superóxido

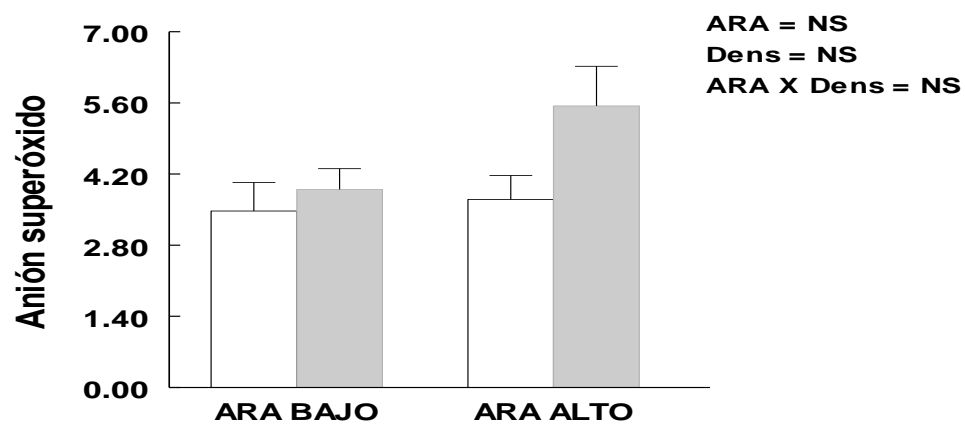


Figura 16. Número de hemocitos totales y anión superóxido (promedio \pm error estándar) analizados en juveniles de camarones *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés físico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA

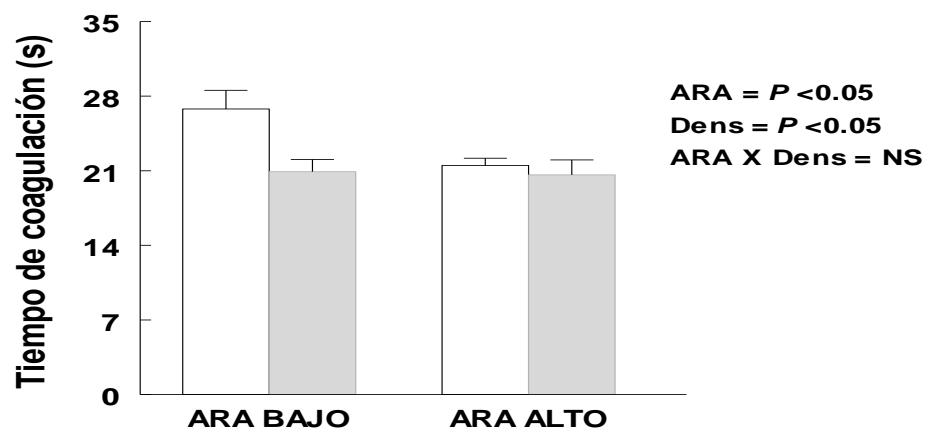
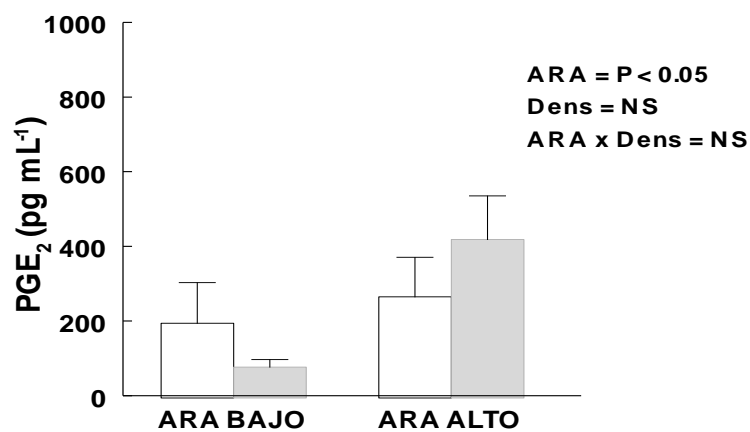


Figura 17. Tiempo de coagulación (promedio \pm error estándar) analizado en juveniles de camarones *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés físico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

7.2.5. Prostaglandinas E₂

Los niveles de PGE₂ en plasma fueron afectados por la cantidad de ARA en la dieta siendo mayores en los organismos alimentados con la dieta alta en ARA, comparados con los organismos alimentados con la dieta baja en ARA ($P < 0.05$). Este comportamiento se observó en los niveles de PGE₂ en hemocitos del mismo grupo de organismos aunque no resultó significativo ($P = 0.08$).

a) PGE₂ plasma



b) PGE₂ hemocitos

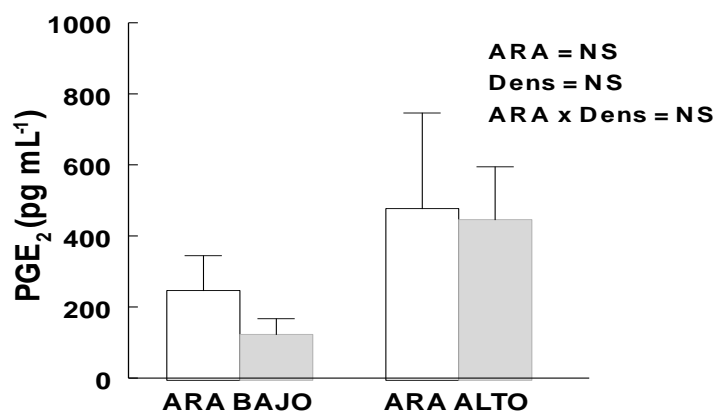


Figura 18. PGE₂ (promedio ± error estándar) analizadas en plasma y hemocitos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés físico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

7.3. ESTRÉS FÍSICOQUÍMICO

7.3.1. Desempeño biológico

El peso inicial de los organismos no fue significativamente diferente entre los tratamientos experimentales. Similar a lo que ocurrió en el estrés físico, los camarones sometidos a una alta densidad de cultivo mostraron un peso final significativamente menor (promedio global: 8.5 ± 0.1 g) que los camarones cultivados a baja densidad (promedio global: 10.4 ± 0.1 g). No se observó efecto significativo en relación a los niveles de ARA en la dieta (Figura 19).

La ganancia en peso (expresada como porcentaje del peso inicial) respondieron de manera similar al peso final, siendo significativamente mayores para los camarones mantenidos a baja densidad de cultivo en comparación con altas densidades de cultivo (promedios globales: 294.8 ± 4.2 vs 240.9 ± 3.4 %). No se observó efecto significativo en relación a los niveles de ARA en la dieta (Fig. 20). La longitud fue mayor en los organismos alimentados con la dieta alta en ARA y en organismos cultivados a baja densidad (11.2 ± 0.1 vs 10.6 ± 0.0 cm). No se observó una interacción significativa (Fig. 21).

El consumo de alimento fue significativamente diferente entre tratamientos, con valores mayores para los organismos cultivados a bajas densidades (media global: 0.33 ± 0.01 g vs 0.26 ± 0.01 g camarón⁻¹día⁻¹, Fig. 22). La sobrevivencia no fue afectada por la densidad de cultivo ni por la dieta. No se observó efecto significativo en relación a los niveles de ARA en la dieta ni a la densidad de cultivo en el número de mudas totales por organismo (Fig. 23).

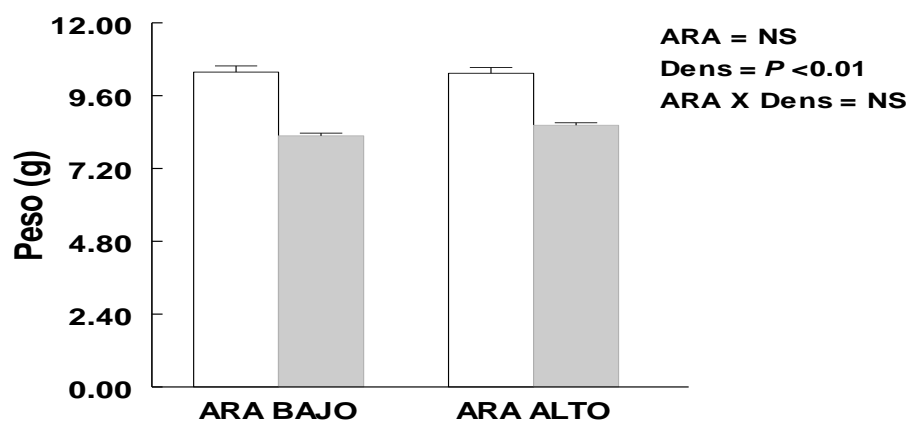


Figura 19. Peso final (g, promedio \pm error estándar) de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

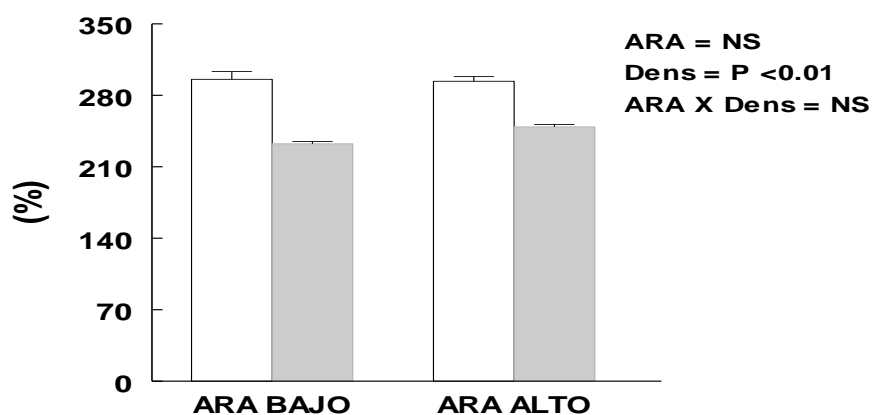


Figura 20. Ganancia en peso (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

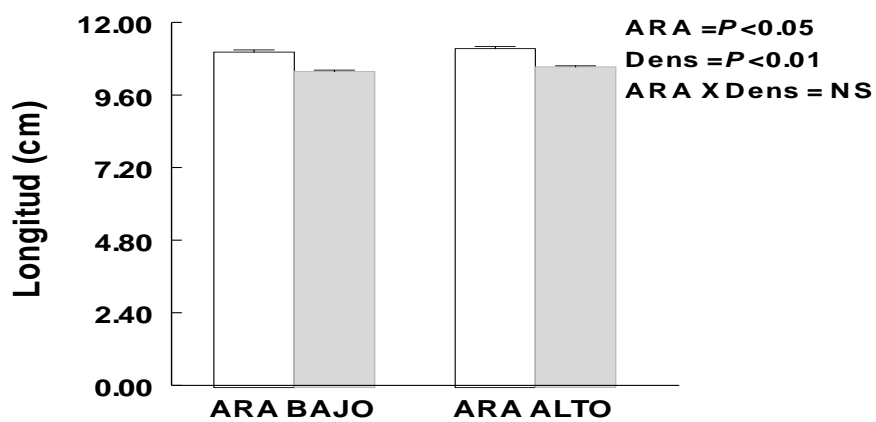


Figura 21. Longitud final (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

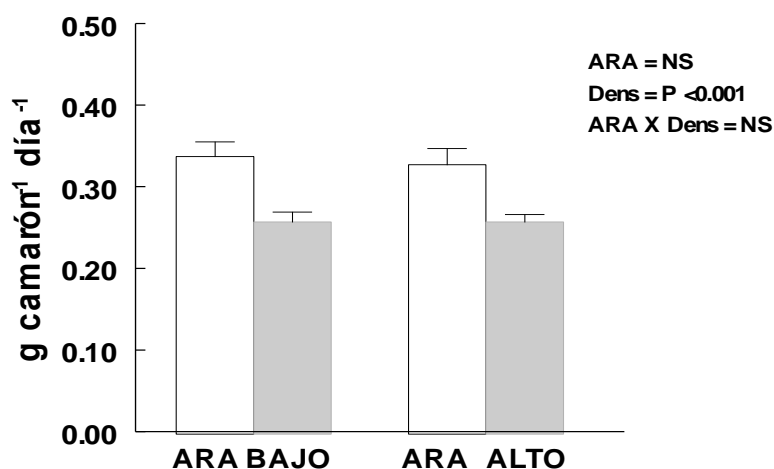


Figura 22. Consumo de alimento (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

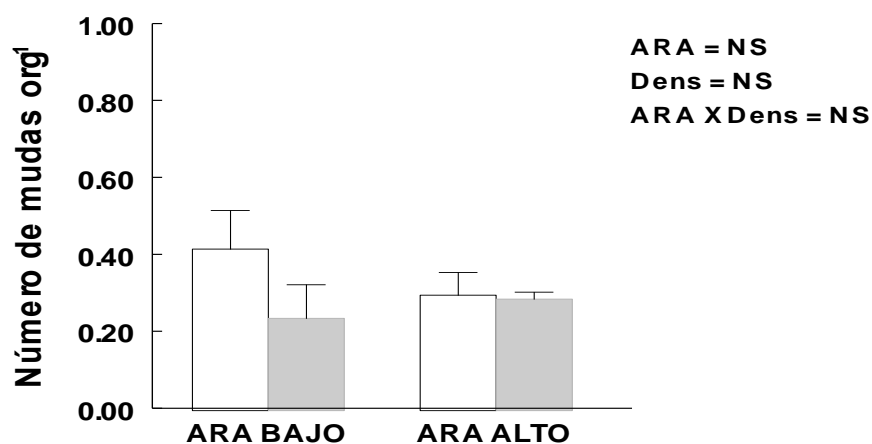


Figura 23. Número de mudas por organismo durante los 30 días de bioensayos (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

7.3.2. Variables metabólicas

Los resultados de las variables metabólicas para el experimento fisicoquímico se muestran en la Tabla VIII. En hepatopáncreas, se observó un efecto significativo por interacción para la concentración de glucógeno y lípidos totales, con valores más altos de glucógeno para los organismos cultivados a alta densidad y alimentados con niveles altos de ARA, y valores más altos de lípidos para los organismos cultivados a baja densidad y alimentados con niveles altos de ARA. No se observaron efectos significativos por cantidad de ARA en la dieta o densidad de cultivo en la concentración de proteínas totales, lactato y triacilglicéridos en hepatopáncreas.

En músculo, los organismos alimentados con la dieta baja en ARA y mantenidos a una alta densidad de cultivo presentaron la mayor concentración de glucógeno, mientras que los cultivados a alta densidad pero alimentados con la dieta alta en ARA, presentaron la menor concentración de glucógeno. No se observaron diferencias significativas para proteínas y lactato en músculo.

Tabla VIII. Variables metabólicas medidas en hepatopáncreas y músculo de juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar. Las tres últimas columnas muestran los resultados de los ANOVAs: Dens = Densidad; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$.

	ARA bajo		ARA alto		ARA	Dens	ARA x Dens
	16 org	68 org	16 org	68 org			
<i>Hepatopáncreas n=47</i>							
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	78.8 \pm 3.4	75.8 \pm 7.7	75.2 \pm 9.0	77.4 \pm 6.7	NS	NS	NS
Glucógeno (mg g ⁻¹)	8.3 \pm 0.8ab	8.0 \pm 0.8ab	7.7 \pm 1.0b	10.5 \pm 0.5a	NS	NS	*
Lactato (mg g ⁻¹)	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	NS	NS	NS
Triacilglicéridos (mg g ⁻¹)	312.9 \pm 36.5	234.9 \pm 35.5	248.2 \pm 24.3	241.3 \pm 14.1	NS	NS	NS
<i>Músculo n=47</i>							
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	719.3 \pm 44.5	736.9 \pm 61.0	682.3 \pm 47.6	667.4 \pm 59.6	NS	NS	NS
Glucógeno (mg g ⁻¹)	4.8 \pm 0.5b	6.4 \pm 0.6a	5.4 \pm 0.8ab	4.4 \pm 0.4ab	NS	NS	*
Lactato (mg g ⁻¹)	3.5 \pm 0.1	3.5 \pm 0.4	3.4 \pm 0.3	3.3 \pm 0.2	NS	NS	NS

7.3.3. Ácidos grasos en hemocitos

Los resultados de ácidos grasos en hemocitos de camarones del experimento fisicoquímico se muestran en la Tabla 9 para los lípidos de reserva y en la Tabla 10 para los fosfolípidos.

La dieta afectó significativamente el contenido de ARA, 20:5n-3 y 20:2n-6, con mayores niveles de ARA en la dieta de ARA alto y menores de 20:5n-3 y 20:2n-6 con la misma dieta. También se observó una interacción para el 16:0.

En los ácidos grasos de los fosfolípidos se observó un efecto significativo por dieta en el ARA, 14:0 y 18:3n-6, con niveles mayores de ARA y 18:3n-6 y menores de 14:0 en camarones alimentados con la dieta alta en ARA, por lo cual fue afectada también la suma total de HUFA. Solamente el 20:1n-11 fue afectado por la densidad de cultivo, con mayores niveles a densidades más altas. Se observaron interacciones significativas para el 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-6 y la suma de monoinsaturados.

Tabla IX. Principales ácidos grasos (% , promedio \pm error estándar) en los lípidos de reserva de los hemocitos de los camarones alimentados con las dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo. Las tres últimas columnas muestran los resultados de los ANOVAs: Dens = Densidad; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	ARA bajo		ARA alto		ARA	Dens	ARA x Dens
	16 org (n=3)	68 org (n=3)	16 org (n=3)	68 org (n=3)			
Ácidos grasos							
14:0	0.83 \pm 0.07	1.41 \pm 0.20	1.19 \pm 0.34	0.80 \pm 0.22	NS	NS	NS
16:0	16.27 \pm 0.73	17.78 \pm 0.62	17.81 \pm 1.34	15.54 \pm 0.40	NS	NS	*
18:0	11.56 \pm 0.26	13.53 \pm 0.91	16.18 \pm 2.20	13.10 \pm 0.54	NS	NS	NS
22:0	0.52 \pm 0.14	0.67 \pm 0.16	0.57 \pm 0.18	0.47 \pm 0.05	NS	NS	NS
16:1n-9	0.78 \pm 0.14	1.03 \pm 0.20	0.87 \pm 0.17	0.57 \pm 0.07	NS	NS	NS
16:1n-7	1.25 \pm 0.01	1.24 \pm 0.05	0.97 \pm 0.17	0.99 \pm 0.17	NS	NS	NS
18:1n-9	11.22 \pm 0.45	10.10 \pm 0.49	9.22 \pm 1.19	9.75 \pm 1.45	NS	NS	NS
18:1n-7	3.32 \pm 0.04	3.66 \pm 0.18	5.12 \pm 1.31	4.57 \pm 1.31	NS	NS	NS
20:1n-11	1.08 \pm 0.07	1.69 \pm 0.21	3.05 \pm 1.70	2.99 \pm 2.25	NS	NS	NS
22:1n-11	0.33 \pm 0.02	0.78 \pm 0.10	1.72 \pm 0.89	1.99 \pm 1.51	NS	NS	NS
18:2n-6	11.80 \pm 0.57	10.77 \pm 0.62	8.50 \pm 1.75	9.86 \pm 1.88	NS	NS	NS
18:3n-6	0.36 \pm 0.01	0.46 \pm 0.08	0.44 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	NS	NS	NS
18:3n-3	0.85 \pm 0.08	0.81 \pm 0.08	0.60 \pm 0.13	0.74 \pm 0.09	NS	NS	NS
20:2n-6	1.23 \pm 0.12	1.35 \pm 0.06	1.07 \pm 0.07	1.13 \pm 0.04	*	NS	NS
20:4n-6	5.11 \pm 2.10	6.51 \pm 1.57	12.51 \pm 1.22	12.22 \pm 1.85	**	NS	NS
20:5n-3	16.26 \pm 1.63	14.17 \pm 0.92	8.81 \pm 2.10	9.82 \pm 1.91	**	NS	NS
22:6n-3	17.12 \pm 1.40	13.68 \pm 1.67	11.07 \pm 3.12	14.14 \pm 2.89	NS	NS	NS
Σ SAT	29.28 \pm 0.91	33.74 \pm 1.66	36.05 \pm 3.81	30.78 \pm 1.48	NS	NS	NS
Σ MUFA	17.98 \pm 0.31	18.51 \pm 0.51	20.95 \pm 2.53	20.87 \pm 3.51	NS	NS	NS
Σ PUFA	52.73 \pm 1.20	47.74 \pm 3.86	43.00 \pm 6.21	48.36 \pm 4.97	NS	NS	NS
Σ HUFA	38.49 \pm 1.30	34.36 \pm 1.62	32.38 \pm 4.31	36.18 \pm 3.10	NS	NS	NS

Tabla X. Principales ácidos grasos (% , promedio \pm error estándar) en los fosfolípidos de los hemocitos de los camarones alimentados con las dietas baja o alta en ARA, y expuestos a una condición de estrés por alta densidad de cultivo. Las tres últimas columnas muestran los resultados de los ANOVAs: Dens = Densidad; NS = No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$.

	ARA bajo		ARA alto		ARA	Dens	ARA x Dens
	16 org (n=3)	68 org (n=3)	16 org (n=3)	68 org (n=3)			
Ácidos grasos							
14:0	0.67 \pm 0.13a	1.27 \pm 0.35a	0.47 \pm 0.04b	0.57 \pm 0.04b	*	NS	NS
16:0	15.98 \pm 0.94	17.00 \pm 1.02	14.27 \pm 0.06	15.74 \pm 0.41	NS	NS	NS
18:0	12.53 \pm 0.28	14.14 \pm 0.90	13.10 \pm 0.44	12.95 \pm 0.38	NS	NS	NS
22:0	0.47 \pm 0.37	0.65 \pm 0.27	0.20 \pm 0.01	0.23 \pm 0.01	NS	NS	NS
16:1n-9	0.42 \pm 0.11	0.74 \pm 0.22	0.44 \pm 0.08	0.29 \pm 0.02	NS	NS	NS
16:1n-7	1.16 \pm 0.07	1.17 \pm 0.09	0.97 \pm 0.04	1.12 \pm 0.07	NS	NS	NS
18:1n-9	11.96 \pm 0.14	10.60 \pm 0.52	10.54 \pm 0.43	11.66 \pm 0.31	NS	NS	**
18:1n-7	3.47 \pm 0.02	3.62 \pm 0.08	3.50 \pm 0.05	3.55 \pm 0.89	NS	NS	NS
20:1n-11	1.08 \pm 0.01b	1.54 \pm 0.15b	1.25 \pm 0.11a	1.33 \pm 0.13a	NS	*	NS
22:1n-11	0.33 \pm 0.04	0.26 \pm 0.17	0.31 \pm 0.00	0.45 \pm 0.04	NS	NS	NS
18:2n-6	12.68 \pm 0.66	11.38 \pm 0.83	10.90 \pm 0.38	12.46 \pm 0.34	NS	NS	*
18:3n-6	0.43 \pm 0.00b	0.36 \pm 0.02c	0.48 \pm 0.01ab	0.52 \pm 0.01a	**	NS	**
18:3n-3	0.92 \pm 0.09	0.80 \pm 0.09	0.77 \pm 0.05	0.87 \pm 0.04	NS	NS	NS
20:2n-6	1.43 \pm 0.15	1.54 \pm 0.08	1.58 \pm 0.13	1.41 \pm 0.07	NS	NS	NS
20:4n-6	4.05 \pm 2.40b	6.40 \pm 3.26b	11.24 \pm 2.03a	8.67 \pm 0.89a	*	NS	NS
20:5n-3	13.11 \pm 0.53	13.23 \pm 0.73	11.31 \pm 0.29	10.50 \pm 0.37	NS	NS	NS
22:6n-3	18.59 \pm 2.46	14.84 \pm 2.34	10.03 \pm 0.60	17.41 \pm 0.50	NS	NS	NS
Σ SAT	30.38 \pm 1.14	33.52 \pm 2.33	28.67 \pm 0.67	29.77 \pm 0.21	NS	NS	NS
Σ MUFA	18.42 \pm 0.24a	17.93 \pm 0.49ab	17.01 \pm 0.31b	18.40 \pm 0.17a	NS	NS	*
Σ PUFA	51.21 \pm 1.35	48.55 \pm 2.68	54.32 \pm 0.96	51.83 \pm 0.38	NS	NS	NS
Σ HUFA	35.75 \pm 0.72b	34.47 \pm 2.04b	40.58 \pm 1.23a	36.58 \pm 0.64a	*	NS	NS

7.3.4. Variables inmunes

No se observaron diferencias significativas por tratamientos sobre el conteo total de hemocitos (Fig. 24).

Se observó una interacción significativa en la producción de anión superóxido, con el valor más bajo para los camarones mantenidos a una baja densidad de cultivo y alimentados con la dieta alta en ARA, y el valor más alto en camarones mantenidos a la misma densidad y alimentados con la dieta baja en ARA (Fig. 24).

El tiempo de coagulación fue afectado por la dieta, siendo significativamente mayor para los camarones alimentados con la dieta baja en ARA (Fig. 25).

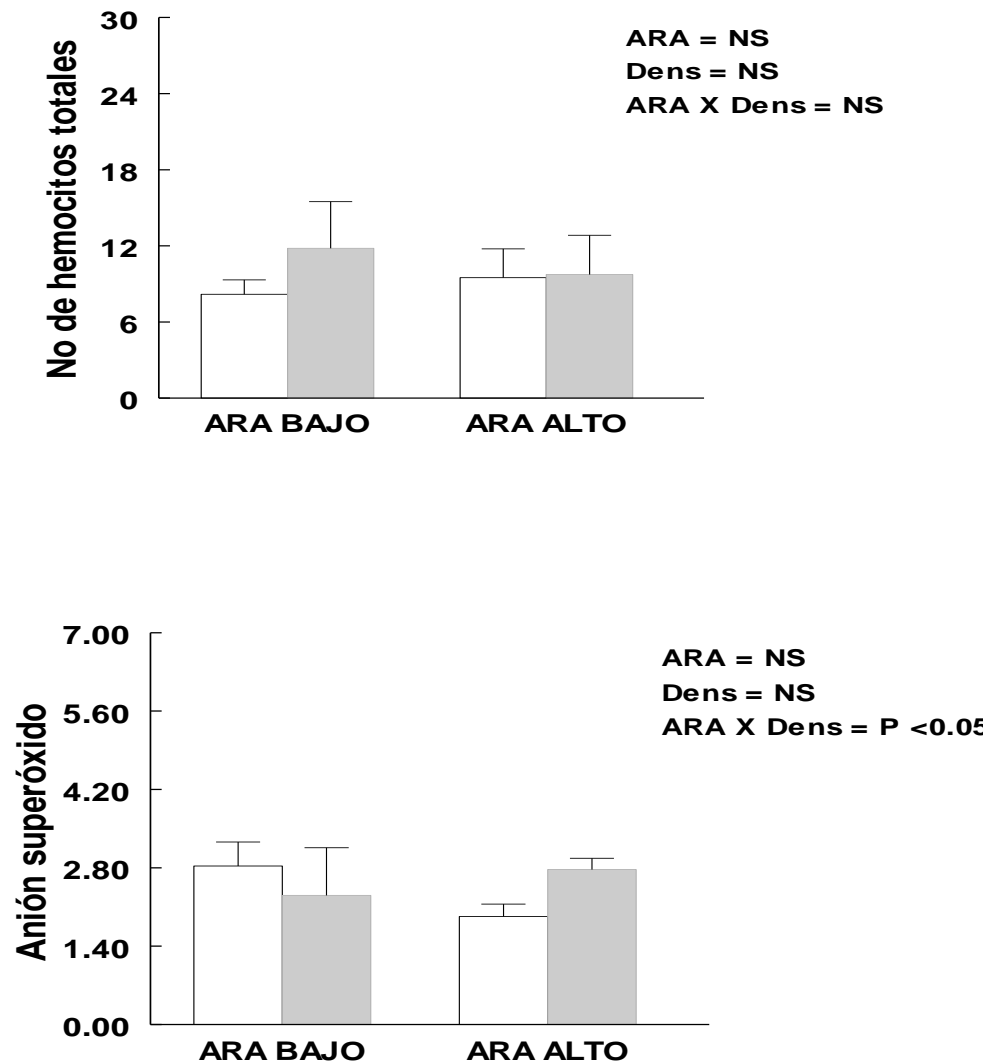


Figura 24. Número de hemocitos totales y anión superóxido (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados a baja (barras blancas) y alta densidad (barras grises) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA, sometidos a un estrés fisicoquímico.

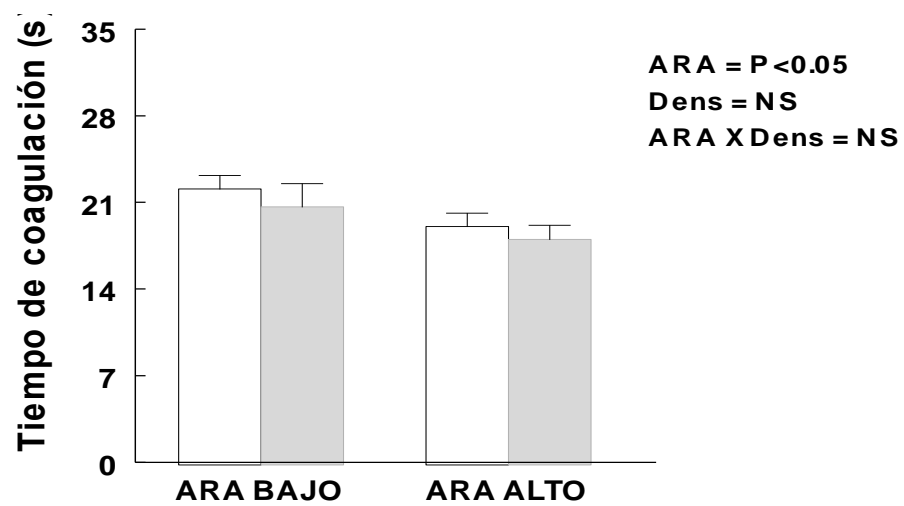
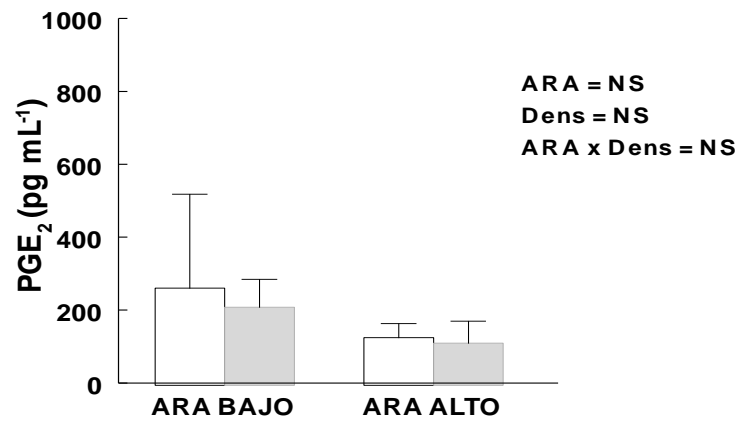


Figura 25. Tiempo de coagulación (promedio \pm error estándar) en juveniles de camarones *Litopenaeus vannamei* cultivados a baja (barras blancas) y alta densidad (barras grises) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA, sometidos a un estrés fisicoquímico.

7.3.5. Prostaglandinas E₂

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de PGE₂ para ninguna de las condiciones experimentales (figura 26).

a) PGE₂ en plasma



b) PGE₂ en hemocitos

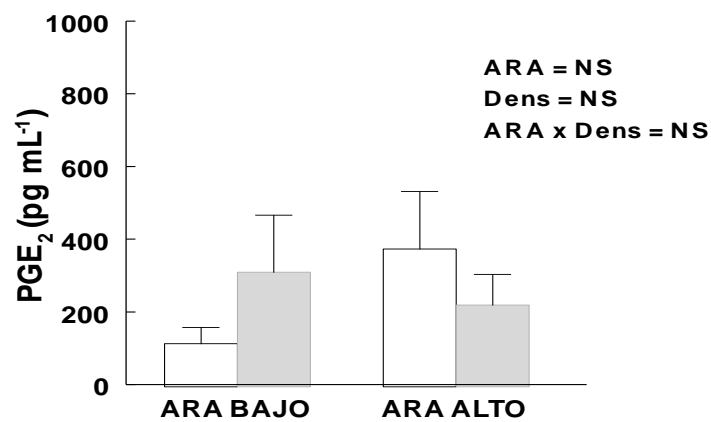


Figura 26. PGE₂ (promedio ± error estándar) analizadas en plasma y hemocitos de juveniles de *Litopenaeus vannamei* sometidos a un estrés fisicoquímico de baja (barras blancas) y alta (barras grises) densidad de cultivo (16 y 68 org m⁻²) y alimentados con dietas que contienen niveles bajo y alto (0.8 y 3.2%) de ARA.

Tabla XI. Resumen de las variables medidas en juveniles de camarón *L. vannamei*, sometidos a un estrés físico, alimentados con dietas baja y alta en ácido araquidónico.

		ARA BAJO		ARA ALTO		EFECTO
		16	68	16	68	
Desempeño biológico	Peso final	>		>		Dens $P < 0.01$
	Longitud final	>		>		Dens $P < 0.01$; ARA X Dens $P < 0.05$
	Ganancia en peso	>		>		Dens $P < 0.01$
	Consumo		>		>	Dens $P < 0.05$
	Número de mudas totales	>		>		Dens $P < 0.01$
Ácidos grasos en hemocitos	Lípidos de reserva					
	14:0; 22:0	>	>			ARA $P < 0.01$
	20:4 n-6			>	>	ARA $P < 0.05$
	Fosfolípidos					
	16:0; 24:0	>	>			ARA $P < 0.05$
	20:4 n-6			>	>	$P = 0.08$
Variables metabólicas	Hemolinfa					
	Glucosa	>	>			ARA $P < 0.05$
	Lactato	>				Dens $P < 0.05$; ARA X Dens $P < 0.01$
	Hepatopáncreas					
	Lactato	>				Dens $P < 0.05$
	Músculo					
	Glucógeno	>	<			ARA X Dens $P < 0.05$
Variables inmunes	Tiempo de coagulación	>				Dens $P < 0.05$; ARA $P < 0.05$
	PGE₂					
	plasma			>	>	ARA $P < 0.05$

Tabla XII. Resumen de las variables medidas en juveniles de camarón *L. vannamei*, sometidos a un estrés fisicoquímico, alimentados con dietas baja y alta en ácido araquidónico.

		ARA Bajo		ARA Alto		EFECTO
		16 org	68 org	16 org	68 org	
Desempeño biológico	Peso final	>		>		Dens $P < 0.01$
	Longitud final	>		>		Dens $P < 0.01$; ARA $P < 0.05$
	Ganancia en peso	>		>		Dens $P < 0.01$
	Consumo	>		>		Dens $P < 0.01$
Ácidos grasos en hemocitos	Lípidos de reserva					
	16:0			>		ARA X Dens $P < 0.05$
	20:2 n-6	>	>			ARA $P < 0.05$
	20:4 n-6			>	>	ARA $P < 0.01$
	20:5 n-3	>	>			ARA $P < 0.01$
	Fosfolípidos					
	14:0	>				ARA $P < 0.05$
	18:1 n-9	>				ARA X Dens $P < 0.01$
	20:1 n-11			>	>	Dens $P < 0.05$
	18:2 n-6; 18:3 n-6				>	ARA X Dens $P < 0.05$ y 0.01
20:4 n-6			>	>	ARA $P < 0.05$	
HUFA			>	>	ARA $P < 0.05$	
Variables metabólicas	<i>Hepatopáncreas</i>					
	Glucógeno			<	>	ARA X Dens $P < 0.05$
	Lípidos totales			>	<	ARA X Dens $P < 0.05$
	<i>Músculo</i>					
	Glucógeno		>		<	ARA X Dens $P < 0.05$
Variables inmunes	Anión superóxido			<	>	ARA X Dens $P < 0.05$
	Tiempo de coagulación	>		>		ARA $P < 0.05$

VIII. DISCUSIÓN

Desempeño general de los camarones

La alta densidad de cultivo afectó negativamente el peso y la longitud final y la ganancia de peso tanto en el experimento físico como en el fisicoquímico. Pero en el experimento fisicoquímico la densidad afectó más la ganancia de peso (241%) que en el experimento físico (271%). Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos que observaron que el crecimiento es reducido a altas densidades de cultivo (Williams *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1998; Nga *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Una posible explicación a la disminución de crecimiento a altas densidades es la competencia por el alimento. Sin embargo, se observó que el consumo de alimento fue distinto entre el experimento físico y el fisicoquímico; mientras que fue mayor para los organismos en alta densidad en comparación con los mantenidos a una baja densidad de cultivo en el experimento físico, fue menor en los de alta densidad en el experimento fisicoquímico. Es posible que en el experimento físico un incremento en el consumo de alimento a altas densidades de cultivo que se pueda atribuir a un incremento en la actividad competitiva por el espacio, que a su vez se traduce en pérdida de energía, con lo que se pudo haber reducido su capacidad de aprovechar el alimento consumido y transformarlo en tejido corporal. En contraste, en el experimento fisicoquímico, el estrés adicional de concentraciones significativamente más bajas de oxígeno disuelto y más altas de amonio a alta densidad, posiblemente afectó negativamente a los camarones al grado de disminuir su ingestión, lo cuál se tradujo en una disminución aún mayor de peso en comparación con los del experimento físico.

En el experimento físico se presentó un número de mudas significativamente mayor en los

organismos mantenidos a una baja densidad de cultivo. Además, en este caso parece ser que el alimento consumido fue debidamente asimilado ya que se obtuvo una mayor ganancia en peso que los mantenidos a alta densidad de cultivo.

En el experimento fisicoquímico no se observaron diferencias en el número de mudas, dado que mismo a bajas densidades el número de mudas encontradas fue bajo con respecto al experimento físico. Es posible que exista una subestimación de las mudas a altas densidades, si los organismos las consumen antes de ser muestreadas. De hecho era de esperarse un incremento en la frecuencia de muda a alta densidad dado que los organismos perciben los cambios ambientales (p.ej. amonio) como tóxicos y se desprenden de su cutícula en respuesta a este estrés. De acuerdo a lo anterior Chen y Kuo (1992), encontraron una mayor frecuencia de muda en *M. japonicus* a altos niveles de amonio. Asimismo, en las granjas se usa rutinariamente sulfato de cobre agregado al agua para inducir la muda en los camarones, que perciben este químico como un estrés. La inducción a la muda se realiza para eliminar epífitas antes de la venta o para sincronizar la muda y disminuir la mortalidad durante el transporte y siembra.

El efecto del amonio sobre el crecimiento y supervivencia de los camarones ha sido ampliamente estudiado. Al respecto, Nga *et al.*, (2005) excluyen al estrés físico como principal factor del impacto negativo del hacinamiento sobre el crecimiento, y mencionan la diferencia en la calidad de agua (toxicidad del amonio) como la principal causa de la reducción de crecimiento en postlarvas de *P. monodon*. El amonio es el principal producto nitrogenado excretado por crustáceos (Claybrook, 1983) y en una solución el amonio total comprende el amonio no ionizado (NH_3) y amonio ionizado (NH_4^+) en equilibrio. Se sabe

que incrementa directamente con el tiempo de cultivo y su acumulación puede deteriorar la calidad del agua, reducir el crecimiento e incrementar el consumo de oxígeno (Chen y Lin 1992; Chen *et al.*, 1994; Racotta y Hernández-Herrera, 2000).

El valor más alto de amonio total se registró en los tanques con la densidad más alta en el experimento fisicoquímico ($2.4 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$), sin embargo, este valor se encuentra muy por debajo de los reportados como letales en diferentes especies de peneidos a diferentes temperaturas y salinidades (ver Tabla XIII).

Tabla XIII. Comparación de niveles letales de amonio (96LC_{50}) en distintas especies de peneidos.

Especie	Temperatura (°C)	Salinidad (ups)	Amonio-N (mg L^{-1})	Referencia
<i>P. monodon</i> (4.87 g)	24.5	20	53.4	Chen <i>et al.</i> , (1990a)
<i>P. chinensis</i> (0.36 g)	26	33	35.1	Chen <i>et al.</i> , (1990b)
<i>P. monodon</i> (2.2 g)	27	34	37.4	Allan <i>et al.</i> , (1990)
<i>P. paulensis</i> (5.45 g)	25	28	38.72	Ostrensky y Wasielesky (1995)
<i>P. vannamei</i> (0.99 g)	26	34	65.2	Frías-Espericueta <i>et al.</i> , (1999)
<i>P. vannamei</i> (3.8 g)	23	34	70.9	Frías-Espericueta <i>et al.</i> , (1999)
<i>P. vannamei</i> (22 mm)	23	15, 25, 35	24.4, 35.4, 39.5	Lin y Chen, (2001)
<i>P. semisulcatus</i> (1.6 g)	14, 18, 22, 26	39	55.8, 36.0, 26.7, 11.4	Kir <i>et al.</i> , (2004)
<i>P. semisulcatus</i> (27.5 mg)	25	30, 35, 40	14.5, 18.7, 19.1	Kir y Kumlu (2006)

Además está por debajo que los niveles estimados como “seguros” para *L. vanammei*, donde se ha reportado un valor de amonio total de 7.1 mg L^{-1} para juveniles (Frías-Espericueta *et al.*, 1999). En el presente estudio, no se observó un efecto sobre la supervivencia, ni en el experimento físico ni el fisicoquímico, en contraste con lo reportado en otros estudios (Ray y Chien, 1992; Martin *et al.*, 1998; Nga *et al.*, 2005; Li *et al.* 2006), lo cual podría deberse a que los niveles de amonio no estuvieron en el rango tóxico para la

especie. En otras especies de peneidos, los valores “seguros” son mas bajos: 1.1 y 1.8 mg L⁻¹ para juveniles y postlarvas de *P. semisulcatus*, respectivamente (Kir *et al.*, 2004; Kir y Kumlu, 2006), 3.5 mg L⁻¹ para juveniles de *P. chinensis* (Chen *et al.*, 1990b) y 4.1 y 4.6 mg L⁻¹ para juveniles y preadultos de *P. monodon*, respectivamente (Allan *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1990a). El valor obtenido en las altas densidades del experimento fisicoquímico, estuvo cercano al nivel de amonio total que inhibe el crecimiento en un 5% durante 3 semanas en juveniles de *P. monodon* (4.1 mg L⁻¹) reportado por Allan *et al.* (1990). Por otro lado, se ha reportado que niveles bajos de oxígeno potencian la toxicidad del amonio (Allan *et al.*, 1990) y pueden tener efecto en diferentes variables fisiológicas (Mugnier *et al.*, 2008). Por lo tanto, no se puede descartar al amonio como una de las razones del menor crecimiento obtenido en los organismos a alta densidad en el experimento fisicoquímico, donde además del efecto del hacinamiento se tuvieron los valores más altos de amonio y los más bajos de oxígeno disuelto.

La concentración de oxígeno disuelto (OD) es de gran importancia para el desarrollo adecuado del camarón en los estanques de cultivo; una exposición prolongada a niveles por debajo de los adecuados pueden comprometer el desarrollo normal del organismo disminuyendo el consumo de alimento y el crecimiento, e incrementar la susceptibilidad a enfermedades (Seidman y Lawrence, 1985; Aquacop *et al.*, 1988), incluso causando un incremento en la mortalidad (Allan y Maguire, 1991). En el experimento físico (densidad 16/68), la concentración de OD (4.7 ± 0.2 mg L⁻¹) estuvo ligeramente por debajo del punto crítico de oxígeno (5 mg L⁻¹) reportado por Martínez-Palacios *et al.* (1996) para juveniles de *L. vannamei* mantenidos a una temperatura de 28°C y a una salinidad de 35 ppm. Por otra parte, la concentración de OD en los tanques de alta densidad del experimento

fisicoquímico (densidad 68/68) fue menor ($3.7 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$), debido al incremento en el consumo del mismo por un mayor número de organismos y la presencia de mayor cantidad de materia orgánica proveniente del alimento y de las heces de los camarones.

La temperatura del agua es quizá la variable más importante en un cultivo porque afecta directamente el metabolismo, el consumo de oxígeno, el crecimiento, la muda y la sobrevivencia (Chen *et al.*, 1995). Considerando su importancia, la temperatura se mantuvo en $26 \pm 0.1^\circ\text{C}$ para ambos experimentos o las tres densidades, y dado que no hubo diferencia significativa, se asume no representó una condición de estrés, ya que permaneció dentro del rango de $25 - 28^\circ\text{C}$ considerado como óptimo para el buen desarrollo en cultivo de *L. vannamei* (Martínez-Córdova, 1999).

Ácidos grasos presentes en los hemocitos y relación con PGE₂

Mientras que los requerimientos de HUFA n-3 han sido ampliamente estudiados en peneidos, los estudios en relación al ARA son más escasos. Sin embargo, este ácido graso es esencial ya que los peneidos tienen una habilidad limitada para su síntesis a partir de su precursor, el ácido linoleico (Lilly y Bottino, 1981). El requerimiento específico de ARA en la dieta de camarones se desconoce, aunque se ha reportado que una dieta con un contenido de 8% ARA del total de los ácidos grasos presentó un efecto positivo sobre el crecimiento que una dieta con 0% ARA (González-Felix *et al.*, 2003). En el presente estudio, no hay diferencia en la supervivencia y crecimiento entre las dos dietas (0.8 y 3.2 % en relación al total de ácidos grasos), por lo que una explicación es que estas cantidades de ARA están dentro del rango de requerimientos de la especie, pero desconocemos si un valor elevado sería aún mejor. Por otro lado, es posible que si el experimento hubiera continuado por un

periodo mas prolongado, se podría observar el efecto sobre el crecimiento, dado que se desconoce la rapidez de recambio de HUFA n-6 en camarones de este tamaño.

Algunos ácidos grasos saturados y monoinsaturados, como el 14:0 y el 22:0 fueron afectados por los niveles de ARA en la dieta, siendo menor en la dieta alta en ARA; además, fue más abundante en los ácidos grasos de la dieta que en los ácidos grasos, tanto de la fracción neutra como polar de los hemocitos. Al respecto Xu *et al.* (1994) mencionan una utilización preferencial de ácidos grasos de cadena corta y mediana como fuentes de energía para el metabolismo en *F. chinensis*. Por otro lado, la proporción de ARA, EPA y DHA fueron mayores en los hemocitos que en la dieta, lo que refuerza la propuesta de una mayor utilización de ácidos grasos de cadena corta para el metabolismo energético y la retención selectiva de ácidos grasos de cadena larga o HUFA para funciones específicas, tal como sugieren Deering *et al.* (1997).

También se observó una mayor proporción de HUFA en los fosfolípidos de los organismos alimentados con altos niveles de ARA, y variaciones en los niveles de algunos ácidos grasos saturados. Pero lo mas interesante, fue la interacción significativa de los PUFA 18:2n-6 y 18:3n-6. La densidad de cultivo por sí sola, no tuvo efecto significativo sobre la composición de ácidos grasos en los hemocitos de los organismos, para ninguno de los dos experimentos, lo cual coincide con un estudio realizado por Calado *et al.* (2005), donde el perfil de ácidos grasos de larvas del camarón de ornato *Lysmata seticaudata* no mostró diferencias significativas a diferentes densidades de cultivo. El que algunos PUFA de la serie n-6 estén afectados inversamente en relación a la dieta ARA y la densidad en los fosfolípidos de los hemocitos sugiere ya sea una síntesis de PUFA n-6 a ARA, o que los

niveles de los PUFA n-6 se incrementaron al no ser requeridos para la síntesis. En cualquier caso, se sugiere evaluar la capacidad de síntesis de HUFA n-6 en esta especie, que aún siendo muy baja, podría ser suficiente para las necesidades de la especie. De esta forma, se debería de considerar si la proporción relativamente alta de ARA en hemocitos en relación a los niveles bajos de la dieta, se deben a una retención selectiva de ARA o a una síntesis de este ácido graso.

El nivel de ARA en las dietas afectó directamente los niveles de ARA en los lípidos de reserva y en los fosfolípidos de los hemocitos de ambos experimentos. El impacto del perfil de ácidos grasos de la dieta sobre tejidos como hepatopáncreas, músculo y branquias de *L. vannamei* ya había sido reportado anteriormente (González-Félix *et al.*, 2002; Hurtado *et al.*, 2006) y la incorporación de HUFA de la dieta en los hemocitos de camarón fue reportado por primera vez por Mercier *et al.* (2009). Mercier *et al.* (2009) observaron una incorporación de HUFA en hemocitos tanto en los lípidos de reserva, como en los fosfolípidos. Mientras que una incorporación de ácidos grasos específicos, en particular HUFA en los lípidos de reserva ha sido reportado para distintas especies, en general cambios en los fosfolípidos son más difíciles de observar dado que en estos, se regula más estrechamente la composición particular de ácidos grasos y su incorporación a cada fosfolípido particular. Por ejemplo, Delaporte *et al.* (2005) mencionan que la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de hemocitos es fuertemente regulada en bivalvos alimentados con diferentes dietas, por lo que la proporción no cambia significativamente aún cuando al organismo se le alimenta con fuertes dosis de EPA y ARA, que se ve reflejada en los lípidos de reserva. La presencia en alta proporción en los fosfolípidos y su

regulación refleja la importancia del ARA en la función de las membranas celulares de camarón para mantener la permeabilidad e integridad para la acción enzimática, transporte de iones y otras funciones asociadas a la membrana (Lilly y Bottino, 1981; Yehuda *et al.*, 1997) y en particular, en *Penaeus esculentus* (Dall *et al.*, 1992).

Los niveles de PGE₂ en plasma tendieron a ser menores en el experimento fisicoquímico en camarones alimentados con niveles altos de ARA (240 vs. 123 pg mg⁻¹ ARA bajo y alto respectivamente), mientras que en el experimento físico se observó lo contrario, un incremento significativo de PGE₂ en plasma en camarones alimentados con niveles altos de ARA (142 vs. 348 pg mg⁻¹ ARA bajo y alto respectivamente).

Dado que la PGE₂ liberada en el plasma proviene de los hemocitos, al comparar los niveles de PGE₂ en estos se observa que en el experimento físico los niveles de PGE₂ tienden a ser mayores en camarones alimentados con la dieta alta en ARA (191 vs. 468 pg mg⁻¹ ARA bajo y alto respectivamente); se podría sugerir que los camarones sintetizan y liberan más PGE₂ cuando se alimentan con dietas ricas en ARA y el estrés solo consiste en hacinamiento. En contraste, en el experimento fisicoquímico los niveles de PGE₂ en hemocitos fueron similares en los camarones alimentados con los dos niveles de ARA (217 vs. 221 pg mg⁻¹ ARA bajo y alto respectivamente).

No se han realizado análisis de PGE₂ en camarón en trabajos previos. En otros organismos, se han reportado valores de PGE₂ de entre 12-40 pg mg⁻¹ en ostión *C. gigas* usando el mismo método de EIA (Reza, 2009). En pez blanco usando el método EIA se obtuvieron valores de 245 pg mg⁻¹ para gónadas de machos y de 375 pg mg⁻¹ para gónadas de hembras (Salgado, 2009). Los niveles de PGE₂ en células testiculares de pez oscilan entre 55 pg ml⁻¹

a más de 4 ng ml^{-1} (Asturiano *et al.*, 2000).

Es de notar que como para los fosfolípidos, también se observó acumulación de ARA en los lípidos de reserva en relación a la dieta alta en ARA en el experimento fisicoquímico, y dicha proporción fue mayor de lo que se observó en los fosfolípidos. Una mayor proporción de ARA en lípidos de reserva podría deberse a que los acilglicéridos podrían fungir como un reservorio de ARA, para que éste ácido graso sea transferido a los fosfolípidos si se requiere para mantener su función en las membranas, tal como la síntesis de eicosanoides. Sin embargo, es posible dados los niveles menores de PGE_2 en hemocitos del experimento fisicoquímico que el ARA no está siendo transferido a los fosfolípidos de forma adecuada, o que no se sintetiza PGE_2 a partir del ARA en los fosfolípidos debido al estrés de las variables ambientales en el experimento fisicoquímico. Es reconocido que la síntesis de PGE_2 , depende de la disponibilidad y la cantidad de ARA que puede ser liberado de la membrana de fosfolípidos en respuesta a un estresor, sin embargo estas hormonas tienen un rápido recambio (turnover) y los niveles circulantes podrían no ser representativos de niveles de liberación de ARA metabolizado (Van Anholt *et al.*, 2004).

Los organismos del experimento fisicoquímico presentaron una disminución de EPA en los lípidos de reserva inversa al incremento de ARA (Tabla 9); un efecto similar, pero no significativo, se observó en los fosfolípidos de los organismos del mismo experimento (Tabla 10). La disminución de ácidos grasos de la serie n-3, especialmente EPA, relacionado al incremento de ARA ya ha sido reportada por Delaporte *et al.* (2006) en branquias de ostión *Crassostrea gigas*. Estos autores concluyeron que esto se debía a la competencia del ARA con el EPA en la producción de eicosanoides, al ser usado como

sustrato para la COX (Bell y Sargent, 2003).

Por último, es de notar que solamente en los fosfolípidos de los camarones del experimento fisicoquímico se observaron interacciones entre densidad y dieta (Tabla 10). Dichas interacciones se observaron para el 18:2n-6 y 18:3n-6, ambos precursores del ARA en organismos que tienen la capacidad de sintetizar HUFA. El 18:2n-6 se encuentra presente en altas proporciones en la dieta, pero el 18:3n-6 no fue detectable en la dieta. En camarones, en el caso del 18:3n-6 los menores valores se observaron en organismos alimentados con dieta baja en ARA y cultivados a altas densidades. Esto podría indicar una necesidad de los organismos en el experimento fisicoquímico de producir más ARA para contrarrestar los efectos del estrés y nos indicaría una capacidad, aún si es baja, de síntesis de HUFA en camarones, en concordancia con lo sugerido por González-Felix *et al.*, 2009).

Respuesta Metabólica

El incremento de lactato en hemolinfa ha sido relacionado como índice de estrés a corto plazo, que resulta del uso de reservas de glúcidos durante el metabolismo anaerobio. En camarones, se ha reportado que el lactato se acumula debido a factores de estrés como inyección de serotonina (Racotta y Palacios, 1998), hipoxia aguda y crónica (Racotta *et al.*, 2002) y por infección de camarones con *Vibrio alginolyticus* (Hsieh *et al.*, 2008). Los valores de lactato obtenidos en el experimento físico ($16-31 \text{ mg dL}^{-1}$) se encuentran por arriba de los reportados como basales por Racotta y Palacios (1998). Este resultado podría reflejar una condición de estrés intrínseco del muestreo y al parecer el efecto del estrés fue disminuido por el incremento del nivel de ARA en la dieta, ya que los camarones alimentados con la dieta baja en ARA mostraron una concentración significativamente mayor de lactato en comparación con los alimentados con la dieta alta en ARA (Tabla V). Un efecto similar fue observado para la glucosa, que aunque no fue afectada por la densidad de cultivo, tal como lo reportaron Hall y Van Ham (1998) en *Penaeus monodon* mantenido durante cuatro semanas a altas densidades, sí se encontró un efecto significativo por el nivel de ARA en la dieta, siendo mayor la concentración de glucosa para los camarones alimentados con la dieta baja en ARA (Tabla V). No obstante, los niveles de glucosa ($14 \text{ a } 19 \text{ mg dL}^{-1}$) obtenidos aún para la dieta baja en ARA están dentro del rango de los reportados como basales ($16-17 \text{ mg dL}^{-1}$) por (Racotta y Palacios, 1998, Sánchez *et al.*, 2001, Mercier *et al.*, 2006).

La glucosa y el lactato parecen ser mejores indicadores de estrés a corto plazo, sin embargo la glucosa también tiende a incrementar en situaciones de estrés a largo plazo como estrés por manejo diario (Mercier *et al.*, 2009), lo que podría explicar por que la glucosa tiende a

incrementar con otro modelo de estrés a largo plazo como es la alta densidad de cultivo, y de nuevo el incremento de ARA en la dieta parece prevenir esta respuesta.

Asimismo, los niveles mas bajos de glucosa en hemolinfa de camarones alimentados con niveles altos de ARA (11 mg dL⁻¹ dieta alta de ARA y 16 mg dL⁻¹ dieta baja en ARA), podrían indicar baja disponibilidad de la misma en camarones alimentados con la dieta alta en ARA, y por ende una menor capacidad de metabolismo anaerobio con producción de lactato.

Durante un estrés crónico, existe la movilización de glucosa hacia la hemolinfa a partir de las reservas de glucógeno en los tejidos, para satisfacer la demanda de sustrato para la glicólisis anaerobia (Racotta *et al.*, 2002). En el experimento físico se observó una disminución significativa del glucógeno en músculo de los camarones alimentados con niveles de ARA bajo y mantenidos a una alta densidad de cultivo. Al parecer, de nuevo la dieta alta en ARA, contrarrestó el efecto de la condición de estrés en los camarones alimentados con la misma.

La importancia de ARA en atenuar el efecto negativo del estrés fue sugerida en peces en un estudio realizado por Koven *et al.* (2001) quienes alimentaron larvas de *Sparus aurata* con rotíferos enriquecidos con ARA antes de someterlas a un estrés por manejo, y como resultado obtuvieron una menor mortalidad en comparación con las larvas que no recibieron este tratamiento.

Para el experimento fisicoquímico, no se pudieron evaluar las variables metabólicas en hemolinfa debido a un problema técnico con el anticoagulante (Ver anexo I).

La comparación de las variables metabólicas en tejidos entre el experimento físico y fisicoquímico mostraron diferencias. En ambos experimentos, se observó una interacción de la densidad de cultivo con la dieta suministrada para los niveles de glucógeno en músculo, pero las respuestas fueron contrarias en relación al experimento. En el experimento fisicoquímico, también se observó una interacción para el glucógeno en hepatopáncreas, con una mayor concentración en los organismos alimentados con la dieta alta en ARA y mantenidos a una alta densidad de cultivo; este efecto no se observó en el experimento físico, pero sí se observó un efecto de la densidad sobre los niveles de lactato en músculo. El común denominador de estos resultados fue la condición de alta densidad de cultivo, que estuvo ligada a los mayores niveles de amonio registrados. Del mismo modo, Racotta y Hernández-Herrera (2000) observaron un incremento en glucógeno en hepatopáncreas y músculo de *L. vannamei* bajo exposición a amonio; al respecto, ellos sugieren el uso reducido de carbohidratos a altos niveles de amonio. Por lo tanto, sería razonable sugerir que los altos niveles de amonio registrados en los tanques del experimento fisicoquímico fueron responsables de la baja utilización de reservas de glucógeno. Es poco probable que los niveles bajos de oxígeno a altas densidades sean los responsables de la movilización de reservas de los tejidos observada aquí, dado que no se observó una acumulación de lactato a altas densidades.

Respuesta Inmune

El número de hemocitos totales circulantes en la hemolinfa (CTH) puede ser afectado por diversos factores como luz, temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto y amonio en varias especies de crustáceos. Estudios previos han sugerido la disminución en el CTH como una respuesta característica a algún tipo de estrés ambiental o fisiológico, como la exposición a hipoxia severa (1 mg L^{-1}) por 24 horas (Le Moullac *et al.*, 1998), aclimatación al cautiverio por 7 días a 27°C (Sánchez *et al.*, 2001), baja salinidad, extirpación del espermatóforo en machos y ablación del tallo ocular en hembras (Perazzolo *et al.*, 2002).

Sin embargo, ni los niveles de ARA en la dieta, ni la densidad de cultivo, tuvieron efectos significativos sobre el conteo total de hemocitos de los organismos pertenecientes a los experimentos físico o fisicoquímico. En otros estudios de estrés a largo plazo como el realizado por Mercier *et al.* (2009), tampoco reportan diferencias significativas en el CTH en *L. vannamei* alimentados con niveles bajo, medio y alto en HUFA durante 24 días. Por su parte, Chim *et al.* (2001) no encontraron diferencias significativas en *L. stylirostris* sometidos a un estrés de salinidad y temperatura por 4 días, después de haberlos alimentado durante 28 días con una dieta baja (0.2%) y alta (1.4%) en HUFA n-3. Liu y Chen (2004) no observaron un efecto sobre ésta variable en *L. vannamei* después de 7 días de exposición a 20 mg L^{-1} de amonio total. Este resultado parece indicar que la condición de estrés crónico en los experimentos (alta densidad de cultivo) no afecta los niveles de CTH de los organismos.

Sin embargo, es posible que los niveles de oxígeno si estén afectando la respuesta inmune. En un estudio realizado por Jiang *et al.* (2005), se concluyó que niveles de oxígeno de 3.5

mg L⁻¹ provocaron una disminución significativa en el CTH y la actividad antibacterial en adultos (8.5 ± 0.5 cm) de *L. vannamei*. En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en el CTH relación a la densidad, pero sí una tendencia a mayor número de hemocitos en organismos a densidades bajas y alimentados con niveles de ARA altos.

El anión superóxido ha sido utilizado como herramienta para detectar estrés en camarones peneidos por cambios ambientales: un leve incremento en la producción de anión superóxido es considerado benéfico, indicando una mayor capacidad de respuesta inmune (Liu y Chen, 2004). Así, Cheng y Chen (2002) reportaron que la exposición de *M. rosenbergii* a 0.55 mg L⁻¹ de amonio durante 168 horas estimuló la producción de anión superóxido. Liu y Chen (2004) indicaron que exponer a *L. vannamei* durante 2 y 7 días a concentraciones de amonio de 11.10 y 21.60 mg L⁻¹ también estimulaba su producción.

Por otro lado, existen otras situaciones donde se ha reportado una falta de efecto o disminución en la producción de anión superóxido. Este es el caso de Cheng *et al.* (2002), quienes no observaron diferencias significativas en anión superóxido en camarones expuestos a 7.75 y 4.75 mg L⁻¹ de OD por 0-120 hrs. Sin embargo una disminución significativa en la producción de anión superóxido (11%) se observó al exponer los camarones a 2.75 y 1.75 mg L⁻¹ por 24 y 6 horas, respectivamente.

En el presente estudio, no hubo efecto significativo en la producción de anión superóxido en el experimento físico, pero sí en organismos del experimento fisicoquímico, donde se encontró una interacción significativa entre la dieta y la densidad de cultivo, con el mayor valor para los organismos alimentados con la dieta baja y el menor con la dieta alta ARA, ambos a baja densidad de cultivo. Con una alta proporción de ARA, esperaríamos un

incremento en la producción de anión superóxido debido a la función que tiene este ácido graso como precursor de leucotrienos de la serie 4, que aumentan la generación de especies reactivas de oxígeno en leucocitos de mamíferos (Calder, 2001). El incremento de anión superóxido en los camarones alimentados con la dieta baja en ARA, coincide con los niveles más elevados de PGE₂ que se encontró en el plasma de éstos organismos.

La coagulación es un mecanismo primario de defensa de los invertebrados en contra de organismos extraños. Tiempos elevados de coagulación implican una disminución en la habilidad de confinar patógenos, indicando una depresión en el estado inmune. En relación a esto, Fotedar *et al.* (2001) reportan un aumento en el tiempo de coagulación de la hemolinfa y una mayor bacteriemia en *Panulirus cygnus* después de 8 horas de exposición al aire fuera del agua. Por su parte Jussila *et al.* (2001) reportaron una relación entre el tiempo de coagulación (TC) y el CTH, donde a mayor CTH se tiene un menor TC. Sin embargo, Mercier *et al.* (2009) no observaron efecto de los niveles de HUFA sobre el tiempo de coagulación. En el presente estudio, tanto en el experimento físico como en el fisicoquímico, el tiempo de coagulación fue mayor en los organismos alimentados con la dieta baja en ARA. Esto hace suponer que el ARA está influyendo de alguna manera en evitar el estrés causado en los organismos, observando que los niveles bajos de este ácido graso afectaron de manera negativa el tiempo de coagulación en la hemolinfa.

Por otro lado, en el experimento fisicoquímico, se observó un efecto de la densidad sobre el tiempo de coagulación, con mayores tiempos de coagulación a menores densidades. Una tendencia similar se observó en el experimento físico. Li *et al.* (2006), reportaron un efecto de la densidad de cultivo, sobre algunas variables inmunológicas, tales como un incremento

en la actividad de la fenoloxidasa y una disminución sobre la actividad de hemolisina a altas densidades. Un tiempo menor de coagulación en camarones alimentados con dietas altas en ARA podría ser efecto de los tromboxanos (TXA₂) Se ha observado que estos eicosanoides tienen efecto en la agregación plaquetaria en vertebrados (Calder, 2006).

IX. CONCLUSIONES

- El crecimiento fue menor a una alta densidad de cultivo. El efecto fue mayor cuando hubo diferencias en la calidad de agua (altos niveles de amonio y bajos de oxígeno) comparado con las condiciones en las cuales no hubo diferencias en la calidad de agua. Sin embargo, la alta densidad de cultivo no tuvo efecto sobre la sobrevivencia.
- El nivel de ARA en la dieta no afectó el desempeño biológico ni la sobrevivencia de los organismos sometidos a estrés crónico por alta densidad de cultivo. El nivel alto de ARA disminuyó la concentración de glucosa y lactato lo que indica una menor susceptibilidad al estrés en los organismos alimentados con esta dieta. La glucosa y el lactato resultan ser mejores indicadores bajo un estrés agudo (intrínseco del muestreo).
- Los niveles más bajos de glucógeno en músculo de camarones en el experimento físico coincidieron con los niveles más altos de glucosa en hemolinfa, lo cual indica movilización durante el estrés, y se observaron en el grupo alimentado con niveles bajos de ARA y cultivados a altas densidades.
- El nivel alto de ARA incrementó los niveles de PGE₂ en plasma pero solamente en el experimento físico. El nivel alto de ARA disminuyó el tiempo de coagulación en ambos experimentos y no afectó significativamente el resto de las variables inmunes analizadas. Lo anterior podría indicar que el efecto del ARA sobre el tiempo de coagulación se debe a otros eicosanoides derivados de ARA, y no necesariamente a las PGE₂.

- A nivel aplicado, los resultados de la presente tesis indican que bajo un sistema de recirculación adecuada, donde se evite la acumulación de amonio y se mantengan los niveles de oxígeno disuelto en el rango apropiado, el estrés físico por hacinamiento no tiene un efecto tan pronunciado sobre las variables de producción (supervivencia, crecimiento) y el estrés de los organismos.

X. RECOMENDACIONES

- 1) Contemplar otras variables inmunes además de las medidas en el presente trabajo, como son la actividad de la superóxido dismutasa y la capacidad de adhesión y fagocitosis en hemocitos y medir las variables inmunes en presencia y ausencia de inhibidores de eicosanoides (PGE₂), para corroborar su relación con los niveles de PGE₂.
- 2) Suplementar ARA en la dieta contrarrestó marginalmente los efectos del estrés sobre el crecimiento de los camarones y disminuyó el tiempo de coagulación. Se recomienda evaluar el efecto del ARA sobre la capacidad de respuesta inmune del camarón sometido a condiciones de alta densidad a través de un reto agudo, como podría ser uno viral para determinar si económicamente es viable la opción de incorporar un inmunoestimulante como el ARA.
- 3) Determinar el requerimiento de ARA en organismos de *L. vanammei*, bajo condiciones de cultivo óptimas y con estrés por densidad.

XI. REFERENCIAS

- Akiyama, D.M., Dominy, W.G. 1989. Penaeid shrimp nutrition for the comercial feed industry. Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M University, Sea Grant College Program, 50 p.
- Allan, G.L., Maguire, G.B., Hopkins, S.J. 1990. Acute and chronic toxicity of ammonia to penaeid prawns and the influence of low dissolved oxygen levels. *Aquaculture* 91, 265-280.
- Allan, G.L., Maguire, G.B. 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 94, 27-37
- A.O.A.C., 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16^o edición. Cunniff, P. (ed.). Arlington, VA, USA, Capítulo 4, 30p.
- Aquacop, Bedier, E., Soyez, C. 1988. Effects of dissolved oxygen concentration on survival and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society (Aquacult. communiques)* 19(1), 13A.
- Arjona, O., Palacios, E. 2009. Análisis de ácidos grasos metil-esterificados (derivatización directa) en alimento peletizado enriquecido con líquidos. Reporte Técnico, 34 pp.
- Asturiano J.F., Sorbera L.A., Zanuy S. y Carrillo M. 2000. Effects of polyunsaturated fatty acids and gonadotropin on prostaglandin series E production in a primary testis cell culture system for the European sea bass. *Journal of Fish Biology* 57: 1563-1574.
- Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3-11.
- Barnes, H., Blackstock, J. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed

- investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 12,103-118.
- Bell, J.G., Sargent, J.R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491–499.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-253.
- Buzoianu, V., Garrido, M., Villalobos, M., Alva, I., García, A., García, F., Hernández, F. 2005. Estudio preliminar de los efectos de los inhibidores de la síntesis de eicosanoides sobre la actividad de fenoloxidasa del acocil (*Cambarellus montezumae*). *Investigación Universitaria Multidisciplinaria Año 5, N°5*.
- Calado, R., Figueiredo, J., Rosa, R., Nunes, M.L., Narciso L. 2005. Effects of temperature, density, and diet on development, survival, settlement synchronism, and fatty acid profile of the ornamental shrimp *Lysmata seticaudata*. *Aquaculture* 245, 221– 237.
- Calder, P.C. 1998. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31, 467-490.
- Calder, P.C. 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 36, 1007-1024.
- Calder P.C. 2006 Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 75, 197-202.
- Camba, E., Pedrazzoli, A., Yaguachi, M., Akiyama, D.M. 1993. Requerimiento de proteínas en dietas artificiales para juveniles de *Penaeus vannamei*. *Acuicultura Tropical* 1, 7-12.

- Campa-Cordova, A.I., Hernandez-Saavedra, N.Y., De Philippis, R., and Ascencio, F., 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology* 12, 353-366.
- Ceccaldi, H.J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M. (eds.) *Crustacean Nutrition* Vol. VI: 261-291.
- Chang, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S., Liao, I.C. 2000. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 505-514.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aiken, D.E. 1994. Neuroendocrine control of hydromineral regulation in the American lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards 1837 (Crustacea, Decapoda) 1. Juveniles. *General and Comparative Endocrinology* 54, 8-19.
- Chen, J-C., y Lin, C-Y. 1992 Oxygen consumption and ammonia-n excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102C, 287-291.
- Chen, J.C, Liu PC, Lei S.C., 1990a. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penaeus monodon* adolescents. *Aquaculture* 89, 127-137
- Chen, J.C, Ting Y.Y., Lin, J.N., Lin, M.N., 1990b. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles. *Marine Biology* 107, 427-431.

- Chen, J.C., Cheng, S.Y., Chen, C.T. 1994. Changes of hemocyanin, protein and free aminoacid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109A, 339-347.
- Cheng, W., Chen J-C. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology* 11, 53–63.
- Cheng, W., Chen J-C. 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., Liu C-H., Hsu, J-P., Chen, J.C. 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, W., Liu, C.H., Yeh, S.T., Chen, J.C., 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 17, 41-51.
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C., 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 18, 1-12.
- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Le Moullac, G., Galois, R., Martin, J.L.M. 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defenses and the resistance of Penaeid

- prawns to environmental stress? *Aquaculture Research* 32, 91-94.
- Civera, R., Guillaume, J. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralisation of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 77, 145-156.
- Claybrook, D.L. 1983. Nitrogen metabolism. In: *The Biology of Crustacea: Internal Anatomy and Physiological Regulation*. L. Mantel, eds. Academic Press, New York. 163-214
- CONAPESCA/ SAGARPA 2008. <http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/prensa.htm>
- D'Abramo, L.R. 1997. Triacylglycerols and fatty acids. En: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (ed.). *Crustacean nutrition: advances in world aquaculture*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, vol. 6, 71-84.
- Dall, W., Chandumpai, A., Smith, D. M. 1992. Fatty acid composition of organs and tissues of the tiger prawn *Penaeus esculentus* during the moulting cycle and during starvation. *Marine Biology*. 113, 45-55.
- Deering, M. J., Fielder, D.R., Hewitt, D.R. 1997. Growth and fatty acid composition of juvenile leader prawns, *Penaeus monodon*, fed different lipids. *Aquaculture* 151, 131-141.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y., Samain, J.F. 2005. Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140A, 460-470
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Giudicelli, E., Lambert, C., Séguineau, C., and

- Samain, J.F. 2006. Impact of 20:4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Lipids 41, 567–576.
- FAO 2004. The State of the World Aquaculture. Capítulo 1: World Review of Fisheries and Aquaculture. 16-17 p.
- Frías-Espericueta, M.G., Harfush-Melendez, M., Osuna-López, J.I., Páez-Osuna F. 1999 Acute Toxicity of Ammonia to Juvenile Shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 62, 646-652
- Fotedar S., Tsvetnenko E., Evans L. 2001. Effect of air exposure on the immune system of the rock lobster *Panulirus Cygnus*. Marine and Freshwater Research 52, 1351–5
- González-Félix, M. L., Perez-Velazquez, M. 2002. Current Status of Lipid Nutrition of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Quintana Roo, México.
- González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Perez-Velazquez, M. 2003. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: II. Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival, and fatty acid composition. Aquaculture Nutrition. 9, 115-122.
- González-Félix, M.L., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M., Perez-Velazquez, M. 2004. The role of essential fatty acids and phospholipids in shrimp nutrition. Aquatunities, Technical Bulletin 2 (1), 6.

- González-Félix, M.L Perez-Velazquez, M., Quintero-Alvarez, M. 2009. Effect of various dietary levels of docosahexaenoic and arachidonic acids and different n-3/n-6 ratios on biological performance of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, raised in low salinity. *Journal of the World Aquaculture Society*.40 (2), 194-206.
- Goytortúa-Bores, E. 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla (*Pleurancodes planipes*) para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría, Universidad de Colima. Colima, Col., México. 86 p.
- Hagerman, L. 1986. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85A, 721-724.
- Hall, M.R., van Ham, E.H. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 290-299.
- Heng , L., y Lei, W. 1998 On the ultrastructure and classification of the hemocytes of penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decápoda) *Chinese Journal of Oceanology Limnology* 16, 333-339.
- Horowitz, A., Horowitz, S., 2001. Disease control in shrimp aquaculture from a microbial ecology perspective. In: Browdy, C.L., Jory, D.E. (Eds.), *Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*. The World Aquaculture Society. 199–218.
- Hsieh, S-L., Ruan Y-H., Li, Y-C., Hsieh, P-S., Hu, C-H., Kuo, C-M. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio*

- alginolyticus*. *Aquaculture* 275, 335–341.
- Hurtado, M.A., Racotta, I.S., Arjona, O., Hernández-Rodríguez, M., Goytortúa, E., Civera, R., Palacios, E. 2006. Effect of hypo- and hyper-saline conditions on osmolarity and fatty acid composition of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) fed low- and high-HUFA diets. *Aquaculture Research* 37, 1316-1326.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164, 277–288.
- Jiang L., Pan L., Bo F. 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* *Fish and Shellfish Immunology* 18, 185-188.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyaluksana, K., Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Kir, M., M. Kumlu, O. T. Eroldogan. 2004. Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* juveniles. *Aquaculture* 241, 479–489.
- Kir, M., M. Kumlu. 2006. Acute toxicity of ammonia to *Penaeus semisulcatus* postlarvae in relation to salinity. *Journal of the World Aquaculture Society* 37, 231-235.
- Kitani, H. 1986. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52, 1131-1139.
- Kontara, E., Coutteau, P., Sorgeloos, P. 1997. Effect of dietary phospholipids for an incorporation of n-3 highly unsaturated fatty acids in postlarval *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 158, 305-320.

- Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tandler, A., 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107-122.
- Koven, W.M., Van Aholt, R., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A. 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* 228, 307-320
- Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., and 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.
- Le Moullac, G., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191, 121-131.
- Li, Y., Li, J., Wang, Q. 2006. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 256, 608-616.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164, 201-220.
- Lilly, M.L., Bottino, N.R. 1981. Identification of arachidonic acid in Gulf of Mexico shrimp and degree of biosynthesis in *Penaeus setiferus*. *Lipids* 16, 871-875
- Liu, C.H., Chen, J.C. 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.T., Cheng, S.Y., Chen, J.C., 2004. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio* infection in relation with the moult cycle. *Fish and Shellfish Immunology*. 16, 151–161.
- Maldonado, M., Rodríguez, J., de Blas, I. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV su principal patógeno. *AquaTic*. 021, 78-91.
- Martin, J.-L.M., Veran, Y., Guelorget, O., Pham, D., 1998. Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds. *Aquaculture* 164, 135–149.
- Martinez-Cordova C.L. 1999. Biología del camarón. Cultivo de camarones peneidos. Principios y prácticas. AGT editor S.A., México, 1-20.pp
- Martínez-Palacios C. A., Ross L. G. y Jimenez V. L. 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei*, Boone 1931. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 11, 59-65.
- Mathews, C., van Holde, K., Ahern, K. 2002. Bioquímica. 3era Ed. España. Pearson. 1, 368 pp.
- Mendoza, R. 1992. Etude de la vitellogenèse et de sa stimulation chez les crevettes péneidés par des facteurs hétérologues et homologues. Tesis de doctorado. Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 200 p.
- Merchant, D., Ertl, R.L., Rennard, S.I., Stanley, D.W., Miller, J.S. 2008. Eicosanoids mediate insect hemocyte migration. *Journal of Insect Physiology* 54, 215–221.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Córdova, Á.I., Tovar-Ramírez, D., Hernández-Herrera, R., Racotta, I.S. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258, 633-

640.

- Mercier, L., Racotta, I.S., Yepiz-Plascencia, G., Muhlia-Almazan A., Civera, R., Quiñones-Arreola, M., Wille, M., Sorgeloos, P., Palacios, E. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. *Aquaculture Research*, en prensa.
- Montero-Rocha, A., McIntosh D., Sánchez-Merino, R., Flores, I. 2006. Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91, 188–194.
- Mugnier, C., Zipper, E., Goarant, C., Lemonnier, H. 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* survival and physiological response in relation to molt stage. *Aquaculture*. 274, 398–407.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachère, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 191, 89-107.
- Murakami, M., Kudo, I. 2004. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Progress in Lipid Research* 43, 3–35
- Nga, B.T., Lürling, M., Peeters E.T.H.M., Roijackers, R., Scheffer, M., Nghia. T.T. 2005. Chemical and physical effects of crowding on growth and survival of *Penaeus monodon* Fabricius post-larvae. *Aquaculture* 246, 455– 465
- Pascual, C., Sanchez, A., Sanchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., and Rosas, C., 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637-

650.

- Paterson, B.D. 1993. The rise of inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus. monodon*) stressed by storage out of water. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106B, 395-400
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barraco, M.A.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214, 19-33.
- Phelps, P.K., Miller, J.S., Stanley D.W. 2003. Prostaglandins, not lipooxygenase products, mediate insect microaggregation reactions to bacterial challenge in isolated hemocyte preparations. *Comparative. Biochemistry and Physiology* 136A, 409–416.
- Pickering, A.D. 1981. Introduction: The concept of biological stress. In: *Stress and fish*. Ed: A.D. Pickering. Academic Press, London 1-10 p.
- Piyatiratitivorakul, S., Rengpipat, S., Viyakarn, V., Nitithamayong, C., Menasveta, P., Mita, T., Maruyama, M. 2001. High efficient closed recirculating tube-system use for *Penaeus monodon* culture. 6th Asian Fisheries Forum 198.
- Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 351-356.
- Racotta, I.S., Hernández-Herrera, R. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology* 125A, 437-443.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Méndez, L. 2002. Metabolic responses to short and long-term

- exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 35, 269-275.
- Ray, W.M., Chien, Y.H. 1992. Effects of stocking density and aged sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, nursery system. Aquaculture 104, 231–248.
- Reza M. 2009. Implementación del análisis de prostaglandinas en tejidos de ostión y comparación de prostaglandina E2 durante el desove del ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) y después de un estrés por muestreo en ostión de placer *C. corteziensis* y *C. gigas*. Tesis de Maestría. Julio 2009.
- Robertson, L., Bray, W.A., Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. Journal of the World Aquaculture Society 18, 180-185.
- Rodríguez, J., Le Moullac, G. 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., Taboada, G., Arena, L., Van Wormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 268, 47-67.
- Ross L.G. and Ross B., 1999. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. Blackwell Science, Oxford. 2^a ed. pp. 176
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172, 63-92.
- Salgado-Garcia, R. 2009. Efecto del ácido araquidónico (20:4n-6) sobre la capacidad reproductiva y el nivel de prostaglandina PGE₂ del pez blanco *Menidia estor*. Tesis

- de maestría. CIBNOR. Junio 2009. 170 p.
- Samuelsson B. 1982. Prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes: Biochemical pathways. Prostaglandins and Cancer: First International Conference. Alan Riss, ed. New York. pp. 19
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.
- Sattar, N. Berry C., Greer I.A. 1998. Essential fatty acids in relation to pregnancy complications and fetal development. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 105, 1248-1255.
- Seidman, E.R., Lawrence, A.L., 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. *Journal of the World Mariculture Society* 16, 333-346.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 3-23.
- Sokal, R.R., Rohlf, J.F., 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*, 3ra edición. W. H. Freeman and Company, New York, USA, 887p.
- Song, Y.L., Hsieh, Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 201-209.

- Song, Y.L., Liu, J.J., Chan, L.C., Sung, H.H. 1997. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Developments in Biological Standardization* 90, 413–421.
- Spotts, D.G., Lutz, P.L. 1982. L-lactic acid accumulation during activity stress in *Macrobrachium rosenbergii* and *Penaeus duorarum*. *Journal of the World Mariculture Society* 12, 244-249
- Sritunyalucksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B, Flegel TW. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish and Shellfish Immunology* 9, 21–30.
- Stanley, D.W., Miller, J.S. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 119, 1–13.
- Sung H-H, Yang YL, Song YL. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, via immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology* 16, 278–84.
- Tacon, A. 1987. The nutrition and feedings of farmed fish and shrimp – a training manual. The essential nutrients. FAO. Field doc.
- Tacon, A. 1990. Standard Methods for the Nutrition and Feeding of the Farmed Fish and Shrimp. Washington: Argent Laboratories Press. 120 pp.
- Tahara, D., Yano, I. 2003. Development of hemolymph prostaglandins assay systems and their concentration variations during ovarian maturation in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 220, 791-800.
- Tseng, K.F., Su, H.M., Su, M.S., 1998. Culture of *Penaeus monodon* in a recirculating

- system. *Aquaculture Engineering* 17, 138– 147.
- Tseng, I.T., Chen, J.C. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology* 17, 325-333.
- Van Anholt, R.D., Spanings, F.A.T., Koven, W.M., Wendelaar Bonga S.E. 2004. Dietary supplementation with arachidonic acid in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reveals physiological effects not mediated by prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology*. 139, 215–226.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry* 11, 256-265.
- Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13-21.
- Vargas-Albores, F., Guzman, 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., Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. 2005. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation. *Aquaculture Research* 36, 352-360
- Vega-Villasante, F., Nolasco-Soria, H., Civera-Cerecedo, R., González-Valdés, R., Oliva-Suárez, M.. 2000. Alternativa para la alimentación del Camarón en Cultivo: El Manejo de la Muda. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M.,

- Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591-625.
- Williams, A.S., Davis, D.A., Arnold, C.R. 1996. Density-dependent growth and survival of *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei* in a semi-closed recirculating system. *Journal of the World Aquaculture Society*. 27, 107-112.
- Wouters, R., Van Hauwaert, A., Naessens, E., Ramos, X., Pedrazzoli, A., Lavens, P. 1997. The effect of dietary n-3 HUFA and 22:6n-3/20:5n-3 ratio on white shrimp larvae and postlarvae. *Aquaculture International* 5, 113-126.
- Xu, X.L., Ji, W.L., Castell, J.D., O'Dor, R.K. 1994. Essential fatty acid requirement of the Chinese prawn, *Penaeus chinensis*. *Aquaculture* 127, 29-40.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Mostofsky, D.I. 1997. Effects of essential fatty acid preparation (SR-3) on brain lipids, biochemistry and behavioural and cognitive functions. In: *Handbook of essential fatty acid biology: biochemistry, physiology, and behavioural neurobiology* (Yehuda, S. & Mostofsky, I. eds), pp. 427-452. Humana Press, Totowa, NJ, USA.

XII. ANEXOS

Anexo I. Efecto de la concentración de anticoagulante (oxalato de sodio) en la composición bioquímica de la hemolinfa.

Durante el muestreo, se produjo un error técnico en la preparación del anticoagulante para la obtención de una parte de las muestras de hemolinfa de los camarones dado que se preparó al 0.5% en lugar del 5% como se recomienda (Mendoza, 1992). Con el oxalato de sodio al 0.5%, la mayor parte de las muestras estaban coaguladas y de hecho así fue como se detectó el error, el cual fue corregido preparando una nueva solución de oxalato de sodio al 5%. De cualquier manera, se realizaron los análisis de todas las muestras y se presentan los datos a continuación. Sin embargo, para los datos presentados en la sección de resultados de este trabajo únicamente se incluyeron los resultados obtenidos con el anticoagulante al 5% por lo cual, y tal y como ya se especificó, existe carencia de datos para algunas variables en algunos tratamientos.

Tabla XIV. Variables bioquímicas en hemolinfa con anticoagulante mal preparado (0.5% de oxalato de sodio). Datos reportados como media \pm error estándar. Se indica el coeficiente de variación entre paréntesis.

	5% oxalato (N = 38-39)	0.5% oxalato (N = 53-56)
Proteínas (mg mL ⁻¹)	162.1 \pm 3.0 (11.7%)	134.9 \pm 4.7 (25%) **
Hemocianina (mg mL ⁻¹)	74.7 \pm 1.8 (15%)	60.3 \pm 1.7 (21%) **
Lactato (mg dL ⁻¹)	20.9 \pm 1.3 (38%)	6.0 \pm 0.6 (69%) **
Glucosa (mg dL ⁻¹)	14.0 \pm 0.9 (39%)	13.8 \pm 0.8 (42%)
Triglicéridos (mg dL ⁻¹)	77.4 \pm 2.8 (23%)	70.0 \pm 2.5 (25%) *

* P < 0.05, ** P < 0.001.

Tal como se puede apreciar en la Tabla XIV, los niveles de proteínas, hemocianina, lactato y triglicéridos son considerablemente mayores para las muestras obtenidas con el anticoagulante preparado adecuadamente. Por otro lado, el coeficiente de variación para los valores de proteínas, hemocianina, lactato es hasta dos veces menor para las muestras obtenidas con el anticoagulante adecuado, mientras que para triglicéridos la diferencia no es tan marcada. En el caso de la glucosa, la concentración de anticoagulante no tuvo ningún efecto y el coeficiente de variación también es similar para ambas condiciones.

Las diferencias obtenidas pueden deberse a diversos factores. Alguno compuestos como las proteínas forman parte del coágulo o bien podrían ser captados por el coágulo, lo cual podría ser el caso de la hemocianina y los triglicéridos. Por otro lado, al coagularse la muestra de hemolinfa, los hemocitos quedarán muy probablemente en el coágulo

inactivándose en el proceso. Por el contrario, al impedir la coagulación, es probable que los hemocitos tengan todavía cierta actividad, aunque mínima dado que están en hielo, que podría representar la liberación de algunos compuestos como lactato o incluso proteínas hacia el plasma que explicaría la mayor concentración de éstos si se impide el coágulo. Aunque durante los muestreos de larga duración de varias horas, se acostumbra centrifugar periódicamente para separar/inactivar hemocitos, sería conveniente establecer el posible efecto de posible liberación de distintos componentes a lo largo del tiempo, sobretodo considerando que para algunos muestreos en campo (laboratorio de producción de postlarvas o granja).