



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y  
ESTATUS ENERGÉTICO DEL CAMARÓN BLANCO,  
*Litopenaeus vannamei*, POR EFECTO DE DISTINTOS  
PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO EN CULTIVO  
INTENSIVO.

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Saúl Zamora Méndez.

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2012

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 21 del Mes de Junio del 2012, 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:

"Evaluación de las respuestas fisiológicas y estatus energético del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, por efecto de distintos procedimientos de muestreo en cultivo intensivo."

Presentada por el alumno:

**Saúl Zamora Méndez.**

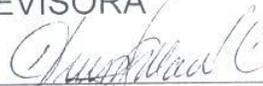
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura.**

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

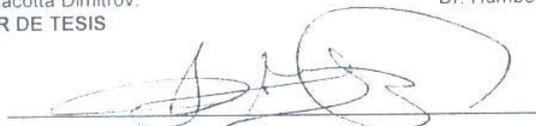
LA COMISION REVISORA



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.  
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Humberto Villarreal Colmenares  
CO-TUTOR



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Director de tesis**

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste S.C.

**Co-tutor**

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste S.C.

**Co-tutor**

Dr. Humberto Villarreal Colmenares

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

**COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Dr. Humberto Villarreal Colmenares

**JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dr. Humberto Villarreal Colmenares

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

**Suplente**

Dra. María Concepción Lora Vilchis

Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste S.C.

## RESUMEN.

Las características del cultivo intensivo del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* favorecen una serie de condiciones de estrés que conllevan efectos negativos tales como la disminución en la tasa de crecimiento, la aparición de patologías e incluso la muerte. Existen una serie de variables metabólicas indicativas de la respuesta fisiológica de estrés, entre las cuales están los niveles circulantes de glucosa y lactato que se incrementan como parte de esta respuesta. El estrés implica también un incremento en el consumo de adenosín trifosfato (ATP) que tiene que compensarse por un aumento en la producción del mismo para poder mantener el balance energético celular inferido por la carga energética adenilica (CEA). Tal como se ha sugerido en peces, la magnitud de respuesta de estrés puede ser un indicador de la susceptibilidad al estrés y por ende del estado de salud del organismo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la respuesta fisiológica de estrés por captura con atarraya en estanque y su posible atenuación por distintos procedimientos de sedación o aislamiento previo, en términos de indicadores bioquímicos y bioenergéticos. Para esto se utilizaron organismos juveniles obtenidos de un estanque de mareas del CIBNOR en condiciones de cultivo intensivo. La respuesta de estrés fue evaluada por efecto del muestreo en cinco condiciones experimentales, 1) cosecha normal con atarraya; 2) misma condición pero utilizando ligera hipotermia (5 °C por debajo de la temperatura del agua) como procedimiento sedativo, 3) misma condición pero utilizando eugenol (aceite de clavo) como anestésico, 4) organismos aislados 16 horas en una tina fuera del estanque, 5) organismos aislados 16 horas en canastas dentro del mismo estanque. Se determinaron las concentraciones totales de glucógeno, glucosa, lactato, proteínas y triglicéridos en hemolinfa, hepatopáncreas y músculo abdominal utilizando métodos colorimétricos. Por otro lado, se cuantificaron los nucleótidos y el fosfato de arginina (Arg-P) en músculo y hepatopáncreas por HPLC.

La condición atarraya sin sedación presentó los mayores valores de lactato y glucosa en comparación con el resto de las condiciones, mientras que los niveles más bajos se obtuvieron bajo las condiciones de aislamiento utilizando canastas dentro del mismo

estanque. Los procedimientos de sedación por hipotermia y anestesia con eugenol solo atenuaron parcialmente el incremento en la concentración de glucosa y lactato en hemolinfa, aunque este efecto dependió de las condiciones del estanque. En cuanto a la utilización de energía celular disponible, el uso de eugenol y el aislamiento previo en canastas presentaron niveles significativamente más altos de CEA y Arg-P comparado con la condición de captura con atarraya sin sedación y atarraya con hipotermia

Se concluye que el aislamiento previo en canastas o jaulas dentro del estanque permite obtener valores basales de diferentes indicadores de la respuesta de estrés en camarón y con ello permite evaluar la magnitud de esta respuesta que a su vez representa un indicador de la susceptibilidad al estrés. Por otro lado, la anestesia con eugenol fue el procedimiento más eficiente para disminuir el gasto de la energía celular disponible (ATP y Arg-P) asociado al estrés por captura y muestreo, sugiriendo su uso para cualquier tipo de muestreo en el cual se requieran medir estas variables.

## ABSTRACT

Intensive farming of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* can induce many stressful conditions that cause negative effects, such as decreased growth rate, increased susceptibility to pathogens, and even death. There are several metabolic variables that reflect the physiological stress response, such as circulating levels of glucose and lactate. Stress also involves an increase in the consumption of adenosine triphosphate (ATP) which must be compensated by an increase in production to maintain cellular energy balance inferred from the adenyl energy charge (AEC). Establishing the magnitude of the stress response could reflect susceptibility to stress and thus represent an indicator of the health of shrimp.

The objective of this study was to use biochemical and bioenergetics indicators of the stress response, induced by capturing shrimp with a cast net, to evaluate possible attenuation of stress by different sedative/anesthetic procedures or previous isolation. Shrimp were obtained from a tidal pond at CIBNOR. The response to stress was measured for five experimental conditions: (1) normal harvest with cast nets, (2) same condition using hypothermia, setting the water temperature at 5 °C below ambient conditions, as a sedative procedure, (3) same condition using eugenol (clove oil) as an anesthetic, (4) isolated shrimp for 16 h in a tank outside the pond, and (5) isolated shrimp for 16 h in baskets inside the pond. Levels of glycogen, glucose, lactate, total protein, and triglycerides in hemolymph, hepatopancreas, and abdominal muscle were determined by colorimetric methods. Nucleotides and arginine phosphate (Arg-P) in muscle and hepatopancreas tissues were quantified by HPLC.

The highest levels of glucose and lactate occurred in shrimp captured with a cast net and without any sedation or anesthesia, compared to the other treatments. The lowest levels occurred in shrimp previously isolated in baskets. Sedation by hypothermia and anesthesia with eugenol only partly attenuated the stress-induced increase in glucose and lactate, although it depended on particular conditions in the pond. Regarding the use of available cellular energy, the highest levels of the AEC and Arg-P were observed in shrimp treated with eugenol and previously isolated in baskets, compared with shrimp captured with a cast net and not treated with anesthesia or sedation by hypothermia.

It is concluded that previous isolation in baskets or cages in ponds is the best procedure to measure baseline values of different indicators of stress response in shrimp, which in turn allows the analysis of the magnitude of this response as indicative of the susceptibility to stress. On the other hand, anesthesia with eugenol was the more efficient procedure to decrease available energy expenditure at the cellular level (ATP and Arg-P) associated to capture and sampling stress, suggesting its use for any sampling procedure in which these variables will be measured.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. por brindar su apoyo e instalaciones necesarias para la realización de este trabajo.

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

Agradezco el apoyo recibido a través del proyecto SEP-CONACYT “Evaluación del estatus energético del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, a través de distintos enfoques experimentales en tres condiciones fisiológicas: muda, reproducción y estrés” (clave 101733) tanto por el financiamiento para la investigación como por el apoyo a través de una beca terminal de Maestría (no. Becario 17307).

Agradezco el apoyo técnico de Mayra Vargas, Jesús Aguilar, Enrique Murillo, Bryan Licona y Miguel Regalado durante los muestreos en los estanques. A Olivia Arjona y Arlett Robles para los análisis de nucleótidos y fosfágenos y a Roberto Hernández para el análisis de la composición bioquímica en hemolinfa y tejidos.

Al Dr. Ilie Racotta Dimitrov por dirigir y apoyar en la realización de este trabajo. Al Dr. Francisco Magallón y al Dr. Humberto Villarreal por sus asesorías y valioso apoyo en este trabajo.

A Horacio y Manuel por su las facilidades otorgadas por el centro de computo.

A mis compañeros y amigos de la maestría, a Pao por su ayuda con el inglés y sus comentarios acertados en el escrito.

A todos los que apoyaron directa o indirectamente la realización de este trabajo.

## ÍNDICE

		Paginas
1	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
2	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1	<b>Concepto de estrés.....</b>	<b>2</b>
2.2	<b>Respuesta fisiológica de estrés y sus consecuencias.....</b>	<b>3</b>
2.3	<b>Balance de la Carga Energética Adenilica (CEA).....</b>	<b>8</b>
2.4	<b>Anestesia.....</b>	<b>10</b>
3	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>12</b>
4	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
5	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
6	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
6.1	<b>Experimentos preliminares a nivel laboratorio.....</b>	<b>13</b>
6.2	<b>Experimentos a nivel estanques litorales.....</b>	<b>17</b>
7	<b>Análisis de hemolinfa y tejidos (músculo y hepatopáncreas).....</b>	<b>22</b>
7.1	<b>Métodos analíticos.....</b>	<b>23</b>
7.2	<b>Carga energética (niveles de ATP, ADP, AMP y Arg-P).....</b>	<b>26</b>
7.3	<b>Preparación de estándares.....</b>	<b>28</b>
7.4	<b>Análisis estadísticos.....</b>	<b>29</b>
8	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
8.1	<b>Experimento I: Alimentados vs. Ayunados.....</b>	<b>29</b>
8.2	<b>Experimentos en estanques litorales.....</b>	<b>30</b>
8.3	<b>Experimento I: captura con atarraya sin sedación vs. atarraya con eugenol (2-octubre-2010) .....</b>	<b>37</b>
8.4	<b>Experimento II: Atarraya sin sedación vs. Canastas vs. Tina, del muestreo 09-octubre-2010.....</b>	<b>39</b>
8.5	<b>Experimento III: atarraya sin sedación vs. atarraya con hipotermia, del muestreo del 13-octubre-2010.....</b>	<b>42</b>
8.6	<b>Experimento IV: atarraya sin sedación vs. atarraya con eugenol vs. atarraya con hipotermia vs. Canastas, del muestreo del 19-octubre-2010.....</b>	<b>44</b>
8.7	<b>Experimento V: atarraya sin sedación vs. atarraya con eugenol vs. atarraya con hipotermia vs. Canastas, del muestreo del 30-octubre-2010.....</b>	<b>48</b>
9	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
9.1	<b>Posibles efectos no controlados: ayuno y estadio de muda.....</b>	<b>50</b>
9.2	<b>Estatus metabólico del camarón <i>Litopenaeus vannamei</i> durante los diferentes muestreos en estanques y sus diferentes etapas del ciclo de muda.....</b>	<b>53</b>
9.3	<b>Variación de los valores basales en animales de la condición atarraya sin sedación igual a respuesta de estrés.....</b>	<b>54</b>
9.4	<b>Atenuación de la repuesta metabólica de estrés: variables bioquímicas en hemolinfa y tejidos (músculo y hepatopáncreas).....</b>	<b>65</b>
9.5	<b>Condición atarraya con eugenol.....</b>	<b>68</b>
9.6	<b>Condición atarraya con hipotermia.....</b>	<b>75</b>

<b>9.7</b>	<b>Condición atarraya con aislamiento (canastas y tina) y recuperación....</b>	<b>77</b>
<b>9.8</b>	<b>Carga energética adenilica y Arg-P para las fechas 9 y 19 de octubre....</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>88</b>
<b>11</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Condición: atarraya, eugenol e hipotermia.....	18
Figura 2	Condición canastas.....	19
Figura 3	Condición canastas.....	19
Figura 4	Condición: tina.....	19
Figura 5	Valores de glucosa en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. ....	33
Figura 6	Valores de lactato en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación.....	34
Figura 7	Valores de triglicéridos en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación.....	34
Figura 8	Valores de hemocianina en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación.....	35
Figura 9	Valores de proteína en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación.....	35
Figura 10	Valores de CEA en músculo de <i>L. vanammei</i> sometidos a distintas condiciones de muestreo. ....	41
Figura 11	Valores de Arg-P en músculo de <i>L. vanammei</i> sometidos a distintas condiciones de muestreo. ....	42
Figura 12	Valores de CEA en músculo de <i>L. vanammei</i> sometidos a distintas condiciones de muestreo. ....	46
Figura 13	Valores de Arg-P en músculo de <i>L. Vanammei</i> sometidos a distintas condiciones de muestreo. ....	47
Figura 14	Valores de CEA en hepatopáncreas de <i>L. vanammei</i> sometidos a distintas condiciones de muestreo. ....	47
Figura 15	Valores de glucosa en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. ....	66
Figura 16	Valores de lactato en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. ....	66
Figura 17	Valores de triglicéridos en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados.....	67
Figura 18	Valores de proteínas en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. ....	67
Figura 19	Valores de hemocianina en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. ....	68
Figura 20	Valores de glucosa y lactato en las diferentes fechas de muestreo, donde es utilizó la condición atarraya con eugenol.....	76
Figura 21	Valores de glucosa y lactato en las diferentes fechas de muestreo, donde se utilizó la condición atarraya con hipotermia.....	77
Figura 22	Valores de glucosa y lactato en las diferentes fechas de muestreo, donde es utilizó la condición canastas y tina.....	80

## LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Prueba 1: Sustancias y concentración usadas para conocer su efecto anestésico en camarón blanco. ....	15
Tabla II.	Cantidad inyectada (nmoles en 25 µl) de los diferentes nucleótidos..	28
Tabla III.	Cantidad inyectada (µmoles en 25 µl) de L-Arg-P.....	29
Tabla II	Promedios de las variables metabólicas determinadas en <i>Litopenaeus vannamei</i> del experimento I. (Media ± E.S.).....	30
Tabla III.	Porcentaje de organismos en distintos estadios de muda para cada fecha de muestreo. Se consideraron únicamente lo organismos capturados con atarraya. ....	31
Tabla IV.	Valores iniciales de oxígeno y temperatura en estanque y tina.....	32
Tabla V.	Variables metabólicas en hepatopáncreas en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. ....	36
Tabla VI.	Variables metabólicas en hepatopáncreas en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. ....	37
Tabla VII.	Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de <i>L. vanammei</i> (Media±E.S.) del muestreo 2-octubre-2010.....	38
Tabla VIII.	Valores de oxígeno y temperatura en la condición atarraya sin sedación y atarraya con eugenol a lo largo del muestreo.....	38
Tabla IX.	Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de <i>L. vanammei</i> (Media ± E.S.) del muestreo 9-octubre-2010.....	40
Tabla X.	Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo.....	40
Tabla XI.	Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de <i>L. vanammei</i> (Media ± E.S.) del muestreo 13-octubre-2010.....	43
Tabla XII.	Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo.....	43
Tabla XIII.	Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de <i>L. vanammei</i> (Media ± E.S.) del muestreo 19-octubre-2010.....	45
Tabla XIV.	Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo.....	45
Tabla XV.	Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de <i>L. vanammei</i> (Media ± E.S.) del muestreo 30-octubre-2010.....	49
Tabla XVI.	Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo. ....	49
Tabla XVII.	Valores de glucosa y lactato en hemolinfa de camarones peneidos sometidos a diferentes condiciones de estrés a corto (minutos a horas) y largo plazo (horas a días). ....	56
Tabla XVIII.	Valores de proteínas, hemocianina y acilglicéridos en hemolinfa de camarones peneidos sometidos a diferentes condiciones de estrés....	63
Tabla XXI.	Signos y respuestas comportamentales de camarones bajo anestesia	

	por eugenol. ....	69
Tabla XIXI.	Valores de oxígeno disuelto (OD) y temperatura en el estanque y en las taras para la condición eugenol en distintas fechas de muestreo...	71

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la acuicultura a nivel internacional es considerada una actividad de gran relevancia, aportando cerca del 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación. La acuicultura ha ido incrementando su importancia a nivel mundial, como una alternativa para garantizar la seguridad alimentaria, con tasas de crecimiento que superan el 10% anual y una producción anual que alcanza los 60 millones de toneladas. A nivel nacional, la producción acuícola está dominada por el cultivo de camarón, principalmente en la región noroeste, y se considera que existe un amplio potencial de desarrollo de esta industria para el país (Magallón y Villarreal, 2007).

En México, el camarón representa más del 70% de peso vivo y más del 80% del valor de cultivo de toda la producción acuícola del país. El cultivo de camarón ha crecido desde 1988, cuando prácticamente no existía producción, hasta alcanzar 110, 000 toneladas en el 2006, mientras que la pesca se ha mantenido estable durante el mismo periodo (Juárez, 2008).

La creciente necesidad de obtener mayor producción de biomasa por unidad de superficie cultivada, que supere las obtenidas con los sistemas extensivos y semintensivos, ha llevado a la intensificación de los cultivos. (Aguilar, 2009). Sin embargo, las altas densidades de cultivo implican alteraciones en la calidad de agua y manejo frecuente, entre otras prácticas. Todas éstas producen respuestas de estrés en los organismos, lo que trae consigo una disminución en su crecimiento, mayor riesgo en la aparición de patologías e incluso la muerte. Por lo anterior, se requiere mejorar las prácticas de cultivo y estrategias de manejo así como el contar con indicadores de susceptibilidad a estrés lo que permitiría reducir los efectos adversos adicionales al estrés.

Existen una serie de variables metabólicas indicativas de la condición fisiológica de organismos bajo estrés de las cuales las principales variables afectadas son la glucosa y el lactato que se incrementan como parte de la respuesta de estrés (Racotta y Palacios, 1998; Racotta et al., 2002). El estrés implica también un incremento en el consumo de ATP que tiene que compensarse por un aumento en la producción del mismo para poder mantener el balance energético celular que intercede como carga energética adenilica (CEA) (Atkinson y Walton, 1967; Moal et al., 1989a; Wang et al., 2002; Morris et al., 2005). En base a esto es importante señalar que la captura de organismos de estanques representa una condición

de estrés para el organismo por lo cual los niveles de algunas de las variables que forman parte de la respuesta de estrés reflejan precisamente esta condición de estrés inducida por el muestreo mismo y las condiciones (persecución, confinamiento, hipoxia, temperatura entre otros factores) en las que se encuentran a lo largo de muestreo.

Por lo anterior en este trabajo se evaluó la respuesta fisiológica de estrés causada por condiciones de muestreo, a nivel de respuesta secundaria al estrés y flujo bioenergético celular “CEA”, en camarón blanco. El monitoreo de una gama de variables que permitieron comparar entre diferentes procedimientos de muestreo, para definir la técnica en la cual los organismos muestran el menor estrés por efecto de muestreo.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Concepto de estrés**

Una causa importante de mortalidad en organismos cultivados es el estrés, el cual es inherente a las prácticas comunes de cultivo, tales como el manejo de los organismos y los disturbios ambientales (Ross y Ross, 1999).

Según Pickering (1981), son pocos los conceptos biológicos que han suscitado tantas controversias como lo es el de estrés, y como resultado, existen numerosas definiciones en los trabajos científicos. Se asume que se trata de un estímulo de ciertas características que al interactuar sobre los sistemas biológicos provoca una respuesta: el estrés. Más que una alteración mórbida, el estrés debe ser considerado una respuesta adaptativa destinado a redireccionar aspectos metabólicos y elementos celulares para hacer frente a una situación desfavorable.

El estrés representa entonces una condición del organismo en la cual su equilibrio dinámico, denominado “homeostasis”, es afectado o alterado como resultado de estímulos intrínsecos o extrínsecos, comúnmente denominados “agentes estresantes o estresores” (Chrousos et al., 1992; en Wendelaar Bonga, 1997). Como resultado de éstos, el organismo responde mediante una serie de cambios, tanto de comportamiento, como bioquímicos y fisiológicos, con el objeto de compensar y/o adaptarse ante la nueva situación.

## 2.2. Respuesta fisiológica de estrés y sus consecuencias

El estímulo se puede clasificar de acuerdo a su duración: cuando este se presenta de forma prolongada ya sea de manera repetitiva o continua (días, semanas), se considera que produce estrés crónico. Por el contrario, cuando el estímulo solo se presenta por un corto tiempo de manera puntual (minutos, horas) se considera que produce un estrés agudo (Aguilar, 2009). En la práctica acuícola, la respuesta aguda es causada principalmente por la captura, el manejo, las biometrías, el transporte, entre otros factores; mientras que el estrés crónico es causado por agentes persistentes y de larga duración, como las altas densidades de cultivo, la variación en la calidad del agua, la exposición a nuevos ambientes y la dominancia social (Pickering, 1981; Wedemeyer y McLeay, 1981; Laidley y Leatherland, 1988; Auro y Ocampo, 1999).

Dependiendo de la intensidad del agente estresante, la respuesta de estrés puede presentar dos niveles: a) el de una respuesta de estrés con fines compensatorios y/o adaptativos, que le permite al organismo recuperar su estado de homeostasis, nivel causado por agentes estresantes de impacto mínimo a moderado y, b) el que resulta en la inhibición del crecimiento, afectación en la reproducción y menor resistencia al ataque de patógenos causado por agentes estresantes agudos o crónicos severos que producen una respuesta de estrés que pierde su valor adaptativo y se vuelve disfuncional (Wendelaar Bonga, 1997).

Aunque la respuesta de los organismos frente a los agentes estresores es muy variable; en vertebrados se tiene bien establecido que la respuesta de estrés está regida tanto por el eje hipotálamo-simpático-Interrenal (cromafín) como por el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal interrenal (Chrousos y Gold, 1992). De acuerdo a estos, es común la división de la respuesta de estrés en primaria, secundaria y terciaria. De cada una de estas diferentes repuestas se derivan indicadores cuantitativos (Wedemeyer, 1977; 1981; 1990).

Al respecto la fase inicial o de alarma ante el agente estresor, conocida como respuesta primaria involucra centros cerebrales y liberación de hormonas. Consiste en la activación de los centros neuroendocrinos, que producen como resultado un incremento en los niveles de hormonas en el plasma, tales como las catecolaminas (adrenalina,

noradrenalina y dopamina) y los corticosteroides adrenales (como el cortisol) (Wedemeyer y McLeay, 1981). Esta respuesta primaria es seguida por un periodo de resistencia que comprende la respuesta secundaria o metabólica que involucra la acción de estas hormonas en los tejidos y en sangre, es decir las diferentes modificaciones bioquímicas y fisiológicas producidas por las catecolaminas y los corticosteroides: aumento del consumo de oxígeno, incremento en la actividad cardíaca, hiperglucemia y perturbaciones del balance hidromineral, entre otras respuestas (Wedemeyer y McLeay, 1981).

Dependiendo de la magnitud y duración del estresor, seguirá una última fase de agotamiento (respuesta terciaria) en la cual la salud e incluso la vida del organismo se pueden ver fuertemente comprometidas, afectando procesos vitales como crecimiento reproducción, capacidad de respuesta inmune y consecuentemente, la supervivencia (Pickering, 1981; Wedemeyer y McLeay, 1981; Barton e Iwama, 1991; Ross y Ross, 1999).

La respuesta de estrés en invertebrados es menos comprendida que para vertebrados, aunque existen respuestas que son análogas a la respuesta en peces, los mecanismos neuroendocrinos (respuesta primaria al estrés) son totalmente diferentes (Aparicio-Simón, 2009).

En crustáceos el complejo órgano-X glándula sinusal, desempeña un papel central en las respuestas fisiológicas y la regulación de las actividades biológicas, ya que entre las principales hormonas secretadas por la glándula sinusal se encuentran: MIH (hormona inhibidora de muda), GIH (hormona inhibidora de la gónada), MOIH (hormona inhibidora del órgano mandibular), CHH (hormona hiperglucémica de crustáceos) y NDH (hormona neurodepresora). Algunas de estas hormonas (MIH, GIH, MOIH) tienen una glándula endocrina como segundo órgano blanco, mientras que otros tienen tejidos somáticos como órganos blancos (Rodríguez et al., 2006; Lorenzon, 2005).

Asimismo se ha sugerido una respuesta al estrés mediada por la CHH, que figura como el mecanismo neuroendocrino más conocido en la mediación de la respuesta de estrés en crustáceos ya que se tiene observado un incremento de la CHH relativamente rápido, seguida de hiperglucemia tras la exposición de agentes estresantes. La función principal de CHH es la regulación de los niveles de glucosa en hemolinfa (Lorenzon, 2005; Santos et al., 2001), actuando mediante la estimulación de la glucogenólisis en músculo y en glándula

digestiva así como por inhibición de la síntesis de glucógeno. Las respuestas secundarias en crustáceos en general los cambios metabólicos tienen la finalidad de producir la energía necesaria para restablecer la condición de equilibrio, alterada por la exposición a agentes estresores. En relación a esto se han realizado numerosos trabajos donde se proponen diversos indicadores metabólicos de la respuesta secundaria de estrés. Dentro de los indicadores clásicos de estrés existe cierta información a nivel de respuestas metabólicas de estrés ambiental o por manipulación. Así, los niveles de glucosa, lactato y otros componentes en hemolinfa se ven modificados ante ciertos tipos de estrés como toma repetida de muestras (Racotta y Palacios, 1998), exposición a altas concentraciones de amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000), hipoxia (Racotta et al., 2002), persecución y emersión (Racotta et al., 2003; Racotta et al., 2007), manipulación a largo plazo (Mercier et al., 2006), captura de los organismos del medio silvestre y esfuerzo reproductivo (Pérez-Jar et al., 2006), ablación del tallo ocular (Sainz-Hernández et al., 2008).

La glucosa es el principal monosacárido presente en la hemolinfa de crustáceos y sirve a siete objetivos principales: síntesis de mucopolisacáridos, síntesis de quitina, síntesis de ribosa y fosfato dinucleotido adenina nicotinamida reducido (NADPH), síntesis de glucógeno y fuente de energía como ya se había mencionado tanto por vía aerobia como anaerobia (Chang y O'connor, 1983; Herreid y Full, 1988). Por lo que son esenciales los niveles estables de glucosa en la hemolinfa para un buen funcionamiento de los organismos.

Así, en situación de mayor demanda de energía, se ha reportado que los niveles de glucosa se incrementan como parte de la respuesta de estrés por manipulación (Racotta y Palacios, 1998; Mercier et al., 2009; Aparicio-Simón et al., 2010) así como por cambios ambientales (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Racotta et al., 2002; Mugnier et al., 2008) que pueden ser inducidos experimentalmente. Y en las cuales se alcanzan valores mayores a  $50 \text{ mg dL}^{-1}$  (Aguilar, 2009; Aparicio-Simón, 2009; Racotta y Villarreal datos no publicados), significativamente más altas que los valores basales que se encuentran entre los 10 a los  $20 \text{ mg dL}^{-1}$  (Aguilar, 2009; Aparicio-Simón, 2009; Pascual et al., 2003; Racotta y Villarreal datos no publicados). Asimismo, a nivel de estanques, se ha visto que la simple captura con atarraya ya induce una repuesta de estrés en términos de una notable

hiperglucemia en la cual se alcanzan valores hasta de  $60 \text{ mg dL}^{-1}$  (Aparicio-Simón, 2009; Racotta, datos no publicados). Sin embargo, los niveles de glucosa también pueden reflejar el estado nutricional (Pascual et al., 2003). En este sentido, las concentraciones más bajas se observan en condiciones de laboratorio glucosa de  $10$  a  $15 \text{ mg dL}^{-1}$  (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Racotta et al., 2002; Mercier et al., 2006), donde el aporte de alimento natural es nulo y la toma de muestras de los organismos se realiza en condiciones de ayuno. El alimento natural es mínimo en estanques de concreto al exterior donde los niveles de glucosa ( $17 \text{ mg dL}^{-1}$ ) fueron un poco mayores, finalmente los niveles son mayores en estanques supralitorales ( $38 \text{ mg dL}^{-1}$ ) a estanques de mareas (desde  $37.5$ , hasta  $58 \text{ mg dL}^{-1}$ , datos no publicados) por lo cual a su vez puede deberse a la disponibilidad de alimento natural y no solo al estrés de captura. Con lo anterior, es probable concluir que ambos factores (estrés y alimentación) podrían explicar niveles mayores de glucosa que a nivel de estanques y esto debe tomarse en cuenta para establecer niveles basales.

A nivel de tejidos, la glucosa se metaboliza por vía anaerobia hasta lactato lo cual es una respuesta común en muchas situaciones de estrés (Racotta y Palacios, 1998; Racotta y Hernández, 2000; Pérez-Rostro, 2004; Mercier et al., 2006; Aparicio-Simón et al., 2010). La activación del metabolismo anaerobio es particularmente importante en el camarón en condiciones de hipoxia ambiental (Racotta et al., 2002; Mugnier et al., 2008) o funcional (Racotta y Palacios, 1998; Carreño, 2000; Aparicio-Simón et al., 2010) que se da por actividad muscular intensa como lo es la respuesta de escape del camarón. Así, la respuesta de estrés en términos de incremento de lactato es característica en camarón bajo condiciones de mínimo estrés durante el muestreo los niveles basales pueden ser tan bajos como  $5 \text{ mg dL}^{-1}$  o incluso menores tanto en condiciones de laboratorio como en tanques al exterior (Mercier et al., 2009; Aparicio-Simón et al., 2010), mientras que se pueden alcanzar niveles cercanos a los  $20 \text{ mg dL}^{-1}$  en la mismas condiciones en camarones sujetos a estrés por manipulación. Sin embargo, los niveles obtenidos como respuesta de estrés por captura con atarraya son mucho mayores, obteniéndose niveles hasta de  $150 \text{ mg dL}^{-1}$  en estanques supralitorales (Aparicio-Simón, 2009) y de  $260 \text{ mg dL}^{-1}$  en estanques de mareas (Racotta, datos no publicados).

Como ya se ha mencionado la glucosa puede ser almacenada en forma de glucógeno en el hepatopáncreas, músculos y branquias (Buckup et al., 2008). El glucógeno almacenado puede ser utilizado en la muda, adaptaciones a cambios ambientales como la hipoxia o anoxia, osmorregulación, crecimiento, en las diferentes etapas de reproducción y durante periodos de ayuno (Buckup et al., 2008; Oliveira et al., 2003).

En cuanto a las proteínas, el músculo es el principal almacén en crustaceos (Buckup et al., 2008). Se ha documentado una disminución en los niveles de proteínas en hemolinfa para *Penaeus monodon* expuestos a baja salinidad y altos niveles de amonio (Chen et al., 1994), también en *Penaeus japonicus* en condiciones similares de salinidad y amonio (Chen et al., 1994). Sánchez et al., (2001) reportaron variaciones en los niveles de proteína en hemolinfa de adultos de *Litopenaeus setiferus* en poblaciones silvestres durante la aclimatación a 27°C y 30°C. Pascual et al., (2003), observaron en *Litopenaeus vannamei* que las condiciones de laboratorio produce valores más bajos en proteínas que los observados en camarones recién capturados.

La respuesta terciaria en crustáceos se extiende a nivel de organismo y población y tiene como consecuencias la inhibición del crecimiento, problemas en la reproducción, disminución de la tolerancia a nuevas situaciones de estrés y mortalidad (Wedemeyer y McLeay, 1981). En crustáceos se ha reportado que diversos estímulos ambientales son determinantes en la reducción de la inmunocompetencia, haciendo a los organismos, más susceptibles a contraer enfermedades (Le Moullac y Haffner, 2000; Perazzolo et al., 2002) y eventualmente, afectando la supervivencia.

En cuanto al ciclo de muda se sabe que es un proceso constante que realizan los camarones para aumentar de tamaño y peso. El ciclo de muda se divide en estadios o etapas y afecta profundamente a los organismos, debido a que cada vez, deben desechar y volver a regenerar todos los componentes del exoesqueleto (Chan et al., 1988; Sánchez-Paz et al., 2008). Para *L. vannamei* se mencionan tres etapas (postmuda, intermuda y premuda) las cuales se pueden dividir en varios estadios. Como parte de la etapa de postmuda se encuentra el estadio A y B en donde el exoesqueleto no está calcificado y empieza el endurecimiento de este, a continuación sigue la etapa de intermuda, o estadio C en el cual ocurre el proceso de calcificación del exoesqueleto así como el almacenamiento de

nitrógeno, magnesio, calcio, fosfato y glucógeno en la glándula digestiva. La etapa de premuda o estadio D ha sido dividida en D0, D1, D2, D3 y D4 esta etapa se caracteriza por incrementos en la concentración de proteínas y los ecdisteroides de la hemolinfa así como la absorción de componentes del antiguo exoesqueleto (Chang., 1995, Chan et al., 1988).

Existen una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos registrados en los diferentes tejidos a lo largo del ciclo de muda. Según Chang (1995) en la glándula digestiva se han encontrado diferentes concentraciones de carbohidratos, lípidos y proteínas, la mayor concentración de aminoácidos libres y lípidos se encontró en premuda. Ciertos estudios concuerdan en que los estadios para *L. vannamei* que comprenden intermuda la concentración de glucosa en la hemolinfa es similar y esta cambia en las etapas de premuda y postmuda (Chan et al., 1988 y Galindo et al., 2009), para el caso de proteínas en hemolinfa Cheng et al., en el 2002 y Galindo et al., en el 2009, encontraron una mayor concentración en hemolinfa para los estadios de premuda la cual disminuye considerablemente durante la postmuda. El consumo de oxígeno aumenta en premuda y disminuye en postmuda. Sin embargo, el ciclo de muda se ve afectado por factores ambientales como la temperatura, el fotoperíodo, la alimentación, el espacio y contaminantes (Chang, 1995).

### **2.3. Balance de la Carga Energética Adenilica (CEA)**

La bioenergética estudia de forma cuantitativa los intercambios y transformaciones de materia y energía entre los organismos y su ambiente (Lucas, 1996). Por lo que además de las respuestas ya mencionadas el estudio de los procesos bioenergéticos en los organismos permite entender de qué manera se obtiene, se almacena, se transfiere y se utiliza la energía para mantener las funciones vitales de los organismos y como se ajustan estos procesos en etapas o situaciones particulares de demanda energética, como lo es el estrés. Existen diferentes enfoques experimentales para el estudio de la bioenergética que van desde el nivel molecular hasta el nivel de organismo. Estos enfoques se basan de manera general en el papel central del ATP como intermediario energético celular, en el oxígeno como aceptor

final de electrones en la fosforilación oxidativa donde se genera el ATP y en los combustibles y reservas que a través de su catabolismo oxidativo producen los intermediarios reducidos (NADH) donadores de protones para la síntesis de ATP.

Un indicador directo de la energía celular disponible para realizar el trabajo biológico se basa en los niveles relativos de ATP, ADP y AMP, comúnmente representados como carga energética adenínica (CEA) =  $(ATP + 1/2ADP) / (ATP + ADP + AMP)$  (Atkinson y Walton, 1967).

Además del ATP, el fosfato de arginina (Arg-P) constituye un reservorio importante de energía en el músculo de invertebrados (Ellington, 2001). Existen varios estudios que analizan la CEA o los niveles de Arg-P como indicadores del estado energético y fisiológico general del organismo de moluscos y crustáceos en condiciones que ocurren de manera común durante el cultivo, o bien en relación al grado de contaminación ambiental. Así, para ostión japonés (*Crassostrea gigas*), la CEA disminuye por efecto de la emersión (Moal et al., 1989b) o de la exposición a sulfitos (Le Moullac et al., 2008), presenta una relación inversa con el ciclo reproductivo (Moal et al., 1987) y tiene un relación directa con el nivel trófico del medio (Moal et al., 1991a; 1991b). En el camarón *Palaemon serratus*, la exposición a altas concentraciones de amonio disminuye la CEA proponiéndolo como un indicador del límite de la capacidad de respuesta de un organismo ante un estrés ambiental (Marazza et al., 1996). En el camarón *Penaeus chinensis*, se obtienen los valores más altos de CEA en el pH óptimo mientras que ésta disminuye paralelamente a la supervivencia a pH ácidos o alcalinos (Wang et al., 2002). La relación entre CEA y temperatura en el langostino *Macrobrachium nipponense* es bastante compleja y, en este caso, no hay una relación clara con valores más altos de CEA y temperatura óptima de crecimiento (Wang et al., 2006). Además de la CEA, los niveles de Arg-P, se alteran por el efecto combinado de la hipoxia y de la exposición al plomo en *Cherax destructor* (Morris et al., 2005). De hecho, el Arg-P constituye una reserva inmediata de energía adicional al ATP, cuya disminución ha sido bien documentada en crustáceos y moluscos en situaciones en las cuales la síntesis de ATP sobrepasa la demanda, siendo inferior a la producción que la utilización, como son hipoxia o actividad física (Gäde, 1983; England y Baldwin, 1983; Hervant et al., 1995).

## 2.4. Anestesia

Los organismos acuáticos se “estresan” fácilmente con las prácticas rutinarias durante el cultivo y por ende existe mayor, riesgo de enfermedades y muerte por lo que se convierten por sí mismas, en uno de los factores limitantes para el cultivo de organismos. El uso de anestésicos ha demostrado la reducción de muchos de los efectos negativos del estrés durante situaciones de manejo obligado (e.g. biometrías y transporte). Por esto se propone la sedación o anestesia leve como medida para reducir el estrés durante la manipulación de organismos y el uso de un sedante/anestésico seguro, ecológico y barato es deseable (Ross et al., 2007). El aceite de clavo es un anestésico eficaz de uso común; su ingrediente activo es el eugenol, un compuesto fenólico que puede servir como una alternativa a los productos químicos de anestesia comercial (Soltani et al., 2004). La hipotermia es también conocida por reducir el estrés en el manejo de peces ya sea sola o en combinación con anestésicos químicos (Rosas et al., 2002; Pascual et al., 2003; Rosas et al., 2004 y Ross et al., 2007).

### **Aceite de clavo**

El aceite de clavo es un producto natural cuyo principal ingrediente activo es el eugenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol, (70-90 % del total), un compuesto fenólico que se ha convertido recientemente en un anestésico de uso común que puede servir como una alternativa a los productos químicos de anestesia comercial (Waterstrat y Pinkam, 2005).

Aunque existe una cantidad limitada de investigación sobre el uso de anestésicos en crustáceos, se ha visto recientemente que el eugenol y derivados del aceite de clavo son un anestésico seguro, eficaz y de bajo costo en una gran variedad de especies acuáticas incluyendo crustáceos (Coyles et al., 2005; Soltani et al., 2004; Waterstrat y Pinkam, 2005).

Se han realizado estudios en diferentes crustáceos como en *Penaeus semisulcatus* en las que se evaluaron la eficiencia sedante y anestésica en diferentes condiciones de calidad del agua. Este estudio concluye que el aceite de clavo es un anestésico eficaz para *P. semisulcatus* con un intervalo recomendado entre concentraciones 100 y 150 mg L<sup>-1</sup> (Soltani et al., 2004).

También se ha reportado el margen de seguridad del eugenol utilizado como sedante durante el transporte de las postlarvas de camarón blanco indio (*Fenneropenaeus indicus*). Concluyendo que la concentración de 1,3 mg L<sup>-1</sup> es considerada segura (Akbari et al, 2010). Para la langosta *Homerus americanus* las concentraciones recomendadas van de 75-100 mg L<sup>-1</sup> ya que induce un grado razonable de inmovilización y mesura del comportamiento agresivo, lo que facilita su manipulación y diagnóstico (Waterstrat y Pinkam 2005).

### **Hipotermia**

La variación en la temperatura del agua ha sido descrita como uno de los factores abióticos principales en organismos acuáticos. El shock frío (cambio brusco), puede ser definido como una disminución aguda en la temperatura ambiente que tiene potencial para causar una reducción rápida de la temperatura corporal, resultando en una cascada de respuestas fisiológicas y de comportamiento (Donaldson et al., 2008).

Se ha sugerido que la disminución de temperatura (5 o 10 °C por debajo de la temperatura en la que se encuentran) inmovilizan o tranquilizan a los camarones (Rosas et al., 2002; Pascual et al., 2003). Aunque esta práctica es comúnmente utilizada en peces y algunos crustáceos, no existe un sustento real y de hecho no se ha demostrado que dicha disminución atenúa la respuesta de estrés por manipulación. Por el contrario, se ha reportado que la hormona hipergluceémica (CHH) suele elevar el nivel de glucosa circulante de *Carcinus maenas* y *Callinectes sapidus* bajo condiciones de estrés (hiper o hipotermia) (Chung et al., 1999 y Chung J. S., 2010). De manera similar, la disminución en tan sólo 5°C, de 28 a 23°C, causa un incremento significativo en la glucosa en hemolinfa para el caso del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (Kuo y Yang, 1999). La aplicación de la hipotermia es reducir el estrés en condiciones de tiempo prolongado, así se ha utilizado una hipotermia de 10 °C por debajo de la temperatura ambiente del agua como anestésico para el transporte de adultos de *M. rosenbergii*, por tiempos hasta de 19 h con una tasa de supervivencia de 95 %, aunque no se reportan valores de metabolitos indicadores de estrés (Salin, 2005).

El enfriamiento debe ser gradual ya que un rápido descenso en la temperatura puede producir un choque mortal. Así, además de la inmovilización y depresión del metabolismo, bajas temperaturas también pueden causar una disminución de la capacidad osmorregulatoria que puede generar desequilibrios de iones importantes en períodos cortos, lo cual puede producir la muerte (Ross y Ross, 1999). Nuevamente, este procedimiento sería más aplicable a largo plazo dado que una condición en la cual se quiere evitar la respuesta de estrés, el procedimiento sedativo tendría que ser inmediato.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El conocer la variación en la magnitud de respuesta de estrés nos puede indicar la susceptibilidad a condiciones de estrés y esto a su vez representar un indicador del estado de salud del organismo. Para ello es necesario contar tanto con los niveles basales como de respuesta de estrés de una serie de indicadores. La información basada en este tipo de indicadores puede ser útil para tomar decisiones sobre las condiciones óptimas de cultivo. En este sentido, se podría considerar estos indicadores como predictivos, es decir que permitan obtener información antes de observar una respuesta en crecimiento o supervivencia.

### **4. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la respuesta fisiológica de estrés por muestreo en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en cultivo intensivo y su posible atenuación por distintos procedimientos de sedación o aislamiento previo de los organismos, en términos de química de hemolinfa y de indicadores bioenergéticos a nivel tisular (carga energética y niveles de reservas).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Cuantificar y evaluar la posible atenuación de la respuesta de estrés en términos de química de hemolinfa y tisular, carga energética adenilica y fosfato de arginina por medio de sedación con aceite de clavo o hipotermia.
- 2) Cuantificar y evaluar la posible atenuación de la respuesta de estrés en términos de química de hemolinfa y tisular, carga energética adenilica y fosfato de arginina por medio de aislamiento previo de los organismos.

## **5. HIPÓTESIS**

El implemento de algunos procedimientos durante el muestreo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, podría evitar o reducir la repuesta intrínseca de estrés inducida por el muestreo mismo y por lo tanto obtener niveles basales de una serie de indicadores de los organismos en estanques de cultivo intensivo, como la química hemolinfática e indicadores bioenergéticos tisulares.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Experimentos preliminares a nivel laboratorio**

#### **Experimento I: anestésicos**

Los organismos utilizados para los experimentos “anestésicos” y “alimentados vs. ayunados” fueron obtenidos de un stock en donde se encontraban en contenedores de fibra de vidrio con capacidad de 2000 L, en el laboratorio de nutrición experimental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Estos organismos se encontraban bajo condiciones controladas (28 °C de temperatura, fotoperiodo natural, aireación constante, 36-38 ups, recambio de agua diario reponiendo el volumen perdido por el sifoneo, con alimentación dos veces por día a una razón total del 5 % de la biomasa).

Estos experimentos se plantearon para evaluar las eficiencias sedantes y anestésicas de una serie de productos comerciales. Además se registró los principales eventos característicos de la sedación/anestesia así como de los tiempos de anestesia total y de recuperación.

Anestésicos utilizados:

- I. Lidocaína solución inyectable al 2%.
- II. Aceite de clavo<sup>1</sup> (80% de eugenol), se obtuvo una muestra donada por investigadores de la línea de peces del CIBNOR.
- III. Aceite de clavo<sup>2</sup>, adquirido en una clínica de masajes relajantes por lo que probablemente contiene otras sustancias.
- IV. Esencia de clavo adquirido en farmacia, es utilizado como suplemento alimenticio.
- V. Eugenol adquirido en farmacia.

Para la primera prueba se utilizaron 5 contenedores cada uno con 5 L de agua marina a 28 °C. En cada contenedor se colocó 1 camarón *Litopenaeus vannamei* y a cada contenedor se le agregó una dosis de anestésico (tabla I). Se monitoreó la actividad de los camarones, en base a su comportamiento y se cuantificó el tiempo en que los organismos perdieron movilidad, registrando los cambios que se fueron presentando que se pueden resumir en la siguiente secuencia de eventos:

- 1) Pérdida de nado.
- 2) Pérdida de postura pero mantiene cierto movimiento de pleópodos.
- 3) pérdida de movimiento de pleópodos.
- 4) Ausencia de respuesta ante un estímulo mecánico.

Se anotaron los tiempos en que se detectaron los principales eventos. Tal como se puede apreciar en la tabla I, al probar estos productos conseguidos de distintas fuentes, solo el aceite de clavo<sup>1</sup> y eugenol fueron eficientes.

**Tabla XX. Prueba 1: Sustancias y concentración usadas para conocer su efecto anestésico en camarón blanco.**

Sustancia y	Concentración ( mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo y observaciones
Lidocaína	250	Sin efecto
Aceite de clavo	50	17 minutos, solo disminución del movimiento
Aceite de clavo	100	4 minutos, perdió el movimiento 5-6 minutos, pérdida de postura 7 minutos, persiste reacción al estímulo mecánico
Esencia de clavo	50	Sin efecto
Esencia de clavo	100	Sin efecto
Eugenol *	100	10 minutos, pérdida de movimiento y ya no hay reacción a la estimulación mecánica

Organismos ( $\geq 30$  gr).

\*Para el eugenol no se realizó la prueba el mismo día que los otros productos.

En segundo lugar se quiso analizar si era factible obtener hemolinfa en camarones inmovilizados por el aceite de clavo por lo cual se repitió el mismo protocolo con aceite de clavo. Sin embargo se tuvo que incrementar la dosis total a 150 mg L<sup>-1</sup> al cabo de diez minutos, dado que transcurrido ese tiempo, los organismos aun presentaban reacción al estímulo mecánico con la dosis inicial de 100 mg L<sup>-1</sup>. Posterior al incremento en la dosis, el organismo perdió la movilidad a los cuatro minutos y la respuesta al estímulo fue mínima a los diez minutos, obteniéndose la muestra de hemolinfa sin mayor dificultad, la cual se extrae a partir de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal utilizando una jeringa de 3 ml que fue embebida previamente en oxalato de potasio como anticoagulante (Mercier et al., 2006). Se repitió el procedimiento en otros dos organismos que fueron colocados en la misma agua de manera consecutiva. La potencia del anestésico se fue perdiendo dado que el segundo organismo seguía con movimiento de pleópodos a los 20 minutos y el tercer organismo a los 30 minutos. Un cuarto organismo se expuso a una dosis de 100 mg L<sup>-1</sup> pero por un tiempo más prolongado con lo cual a los 30 minutos aun mantenía la postura y tenía movimiento de pleópodos, aunque a la hora ya no presentó ninguna reacción. A los cuatro organismos se les extrajo hemolinfa (0.5 ml).

Si bien el aceite de clavo<sup>1</sup> fue eficiente, el producto fue donado y no se contaba con la información sobre la fuente original del producto por lo cual se hizo una búsqueda en negocios locales en donde se encontró eugenol<sup>1</sup> (la sustancia activa del aceite de clavo). En una tercera prueba se comparó el efecto sedativo del aceite de clavo<sup>2</sup>, con el del eugenol en tres organismos para cada anestésico (peso promedio de 25 g) y se obtuvieron efectos similares con pérdida de movimiento y de reacción a la estimulación mecánica al cabo de diez minutos. En todos los casos se logró obtener hemolinfa (0.25 ml) y en este caso no se observó una pérdida de potencia del anestésico al colocar los organismos en la misma agua de manera consecutiva.

Finalmente, en una cuarta prueba se analizó la sedación en masa de varios organismos para lo cual se colocaron 11 organismos de aproximadamente 4 g en una tara con una concentración de eugenol de 100 mg L<sup>-1</sup> observándose que a los 14 minutos cuatro organismos empezaron a perder la postura, pero aun presentaban movimiento en los pleópodos. A los 29 minutos todos perdieron la postura (algunos todavía con movimiento de los pleópodos). A los 42 minutos tres organismos perdieron el movimiento por completo y se muestreo a los 60 minutos cuando todos los organismos ya no presentaban movimiento alguno. Se obtuvieron 0.25 ml de hemolinfa en promedio. Posterior a la obtención de hemolinfa, los organismos se pasaron a una nueva tara con agua nueva, para su recuperación. Al cabo de 60 minutos los organismos siguen sin reaccionar y después de 15 horas solo siguieron vivos cinco y en estado normal. Sin embargo, no fue claro si la alta mortalidad observada fue por la obtención de hemolinfa, la anestesia, la manipulación excesiva de los camarones o un efecto sinérgico de estos factores.

## **Experimento II: ayunados vs. alimentados**

El objetivo de este experimento fue evaluar si existía variación en la comparación bioquímica de hemolinfa y tejidos en relación al ayuno. Se utilizaron 12 organismos obtenidos del laboratorio de maduración de crustáceos, con un peso promedio de 13.7 g los cuales se encontraban bajo condiciones controladas (28 °C de temperatura, fotoperiodo natural, aireación constante, 36-38 ups, recambio de agua diario reponiendo el volumen

perdido por el sifoneo). Estos organismos fueron separados en dos jvas en las mismas condiciones ambientales en las cuales se encontraban, estas fueron cubiertas en su parte superior completamente por una red para evitar que los organismos se escaparan. El alimento peletizado comercial 35% proteína, se suministró a saciedad dos veces al día (9:00 am y 5:00 pm).

Se mantuvieron 6 organismos en ayuno aproximadamente 24 horas (último alimento ofrecido a las 9 a.m. del día anterior al muestreo) y en otra jva otros 6 organismos fueron alimentados por última vez a las 5 p.m. del día anterior al muestreo. Todos los organismos fueron muestreados entre las 9-10 a.m. obteniéndose muestras de hemolinfa (ver experimento I) y separando el cefalotórax junto con el primer segmento abdominal el cual fue sumergido en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para los análisis bioquímicos posteriores.

## **6.2. Experimentos a nivel estanques litorales**

Se realizaron cinco experimentos en cinco fechas diferentes, los cuales se hicieron en la mañana a partir de las 8:30 a.m. con duración aproximada de tres horas cada uno. Los organismos fueron obtenidos del estanque litoral número 2 del CIBNOR, en los cuales las variables ambientales (temperatura, oxígeno disuelto y salinidad) no son controladas y la alimentación está basada en el suministro de alimento peletizado, además del alimento natural que se encontraba presente en el estanque. Los organismos fueron capturados con atarraya desde el borde del estanque simulando una biometría (no más de tres lances por día de muestreo a excepción del último muestreo) y colocados en una jva con aproximadamente 40 L de agua del mismo estanque e inmediatamente después fueron separados en jvas con 70 L de agua del mismo estanque a la que se le suministro aireación durante el muestreo y fueron colocados bajo sombra, estos se encontraban en una de las siguientes tres condiciones:

- 1) Condición atarraya sin sedación: Solo aireación (fig. 1).
- 2) Condición atarraya con eugenol: eugenol a una concentración aproximada de  $120\text{ mg L}^{-1}$  (fig. 1).

3) Condición atarraya con hipotermia: con una temperatura de 5°C por debajo de la temperatura del estanque a esa hora (fig. 1).



**Figura 23.- Condición: atarraya, eugenol e hipotermia**

Las siguientes dos condiciones se realizaron un día anterior al muestreo:

1) Condición Canastas: Los organismos fueron obtenidos de la forma ya descrita un día antes por la tarde aproximadamente a las 5 p.m. y colocados en una java con aproximadamente 70 L e inmediatamente después fueron separados en sus respectivas canastas a razón de 1 organismo por canasta. Las canastas se encontraban en la superficie del estanque y fueron cubiertas por una red para evitar que los organismos se escaparan (fig. 2 y 3).

2) Condición Tinajas: En este los organismos fueron separados un día antes, en una tina con aproximadamente 500 L con agua del estanque, manteniéndose con aeración, bajo la sombra y regulación de temperatura de 27 °C con calentadores (fig. 4).



**Figura 24.- Condición canastas**



**Figura 25.- Condición canastas**



**Figura 26.- Condición: tina**

Los niveles de oxígeno disuelto y temperatura fueron registrados al inicio en el estanque, en las distintas condiciones y a lo largo del muestreo. A partir de estas jvas se fueron obteniendo los organismos con una red de cuchara siguiendo la siguiente secuencia de eventos; registro de la hora del muestreo, secado del organismo con una franela, extracción de hemolinfa a partir de la base de los pleópodos del primer segmento abdominal utilizando una jeringa de 3 ml que fue embebida previamente en oxalato de potasio como anticoagulante (Mercier et al., 2006). Se registró el peso en una balanza de campo, corte de urópodo de cada organismo para confirmar el estadio de muda bajo el microscopio (Robertson et al., 1987) el cual fue almacenado en un eppendorf que contenía una solución isotónica de crustáceos (SIC: NaCl 450 mM y KCl 10 mM por litro), corte del cefalotórax junto con el primer segmento abdominal y almacenamiento en una bolsa para

ser congelado en nitrógeno líquido y depositado en el ultracongelador para realizar las determinaciones posteriores como se describe en la sección de análisis.

Los organismos se muestrearon consecutivamente considerando que se encontrarán en estado de intermuda o premuda temprana evaluado a partir de la dureza del caparazón a nivel de cefalotórax, pero sin interesar que tuviesen tallas parecidas. Entre cada organismo hubo un intervalo aproximado de 2 minutos. El número máximo de organismos obtenidos en cada muestreo fue de 50 por lo cual no se sobrepasaron más de dos horas, evitando así variaciones por ciclo circadiano e incremento de la temperatura natural.

Para el caso de la condición canastas, cada organismo fue tomado con la mano directamente de la canasta y se procedió a realizar los pasos mencionados anteriormente. El sistema de canastas presentó un mecanismo de poleas con la finalidad de mantener siempre una canasta con un organismo al borde del estanque, esto permitió trabajar de una manera más eficaz sin tener que estar dentro del estanque o alterando a los organismos con posibles movimientos del agua.

Tal como se mencionó, se trabajó con 5 grupos experimentales (atarraya, eugenol, hipotermia, canastas y tina) y se pretendía obtener al menos 20 organismos por cada grupo. Lo anterior implica el muestreo de al menos 100 organismos lo cual no es factible realizarlo en un día, tanto por el tiempo requerido así como por la logística de captura. En cuanto a la duración del muestreo, es preferible que este no sobrepase de dos horas (8:30 a 10:30 a.m.) tanto por la influencia del ritmo circádico sobre las variables a medir así como para evitar el efecto del incremento de la temperatura dado que se trabajó durante el mes de octubre. Por razones logísticas, tampoco es factible porque no se pueden trabajar más de 10 canastas simultáneamente, no alcanza el nitrógeno líquido para tantas muestras, no es recomendable tener 20 organismos por java en los grupos que implican ese tipo de unidad, entre otras. Por esta razón, se planteó originalmente hacer muestreos parciales en distintos días con varios, pero no todos, los grupos a comparar.

De hecho, la pregunta principal es si algunos de los tratamientos pueden atenuar la respuesta de estrés inducida por la captura con atarraya, la cual se contestó de manera

parcial comparando al menos un tratamiento con el grupo de máxima respuesta de estrés (atarraya sin sedación).

### **Descripción de los muestreos**

#### **Primer muestreo realizado el 02-10-10**

Para este experimento se utilizaron 20 organismos con un peso promedio de 19.7 g divididos en dos condiciones una atarraya con eugenol y la otra atarraya sin sedación.

#### **Segundo muestreo realizado el 09-10-10**

Para este experimento se utilizaron 50 organismos con un peso promedio de 17.9 g divididos en tres condiciones; 19 organismos en la condición atarraya sin sedación, 10 organismos en la condición canastas y 21 organismos en la condición tina.

#### **Tercer muestreo realizado el 13-10-10**

Para este experimento se utilizaron 22 organismos con un peso promedio de 19.9 g divididos en dos condiciones una atarraya con hipotermia y la otra atarraya sin sedación.

#### **Cuarto muestreo realizado el 19-10-10**

Para este experimento se utilizaron 49 organismos con un peso promedio de 20.2 gr. divididos en cuatro condiciones; 10 organismos en la condición canastas, 13 organismos en la condición atarraya sin sedación, 12 organismos en la condición atarraya con eugenol y 14 organismos en la condición atarraya con hipotermia.

#### **Quinto muestreo realizado el 30-10-10.**

Para este experimento se utilizaron 47 organismos con un peso promedio de 23.7 g divididos en cuatro condiciones; 12 organismos en la condición canastas, 11 organismos en la condición atarraya sin sedación, 13 organismos en la condición atarraya con eugenol y 11 organismos en la condición atarraya con hipotermia. Estos organismos no se pudieron obtener del borde del estanque ya que la población era escasa por lo que se tuvieron que

sacar de en medio del estanque tardándose aproximadamente 30 min en una java dentro de la lancha y sin aeración ni sombra, antes de llegar a sus respectivas condiciones (atarraya, hipotermia y eugenol).

## **7. Análisis de hemolinfa y tejidos (músculo y hepatopáncreas)**

Una vez extraída la hemolinfa (ver experimento I) se procedió a realizar los análisis bioquímicos. La hemocianina se cuantificó el mismo día del muestreo, el resto de los análisis bioquímicos de hemolinfa fueron cuantificados posteriormente. Las técnicas fueron adaptadas a microplacas (Racotta y Palacios, 1998), utilizándose kits comerciales y midiendo la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan spectrum) a diferentes longitudes de onda según fuera el caso.

Para realizar los análisis bioquímicos de hepatopáncreas y músculo se utilizaron aproximadamente 100 mg de tejido. Del músculo se tomó una muestra del primer segmento abdominal, mientras que para el hepatopáncreas, se trató de obtener muestras del mismo sitio.

Ambos tejidos fueron disectados sobre una placa fría para evitar su descongelamiento y nuevamente fueron almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis, una vez pesados fueron liofilizados durante 24 horas. A continuación se calculó el porcentaje de humedad y se procedió a hidratar y homogenizar las muestras con agua deionizada y arena libre de materia orgánica en un homogenizador fast-prep24 durante 20s para obtener un extracto crudo. Posteriormente se realizaron las determinaciones bioquímicas, en el caso de músculo se determinó la concentración de proteínas (Bradford, 1976), glucógeno, lactato y glucosa (Racotta y Hernández-Herrera, 2000). Mientras que en el hepatopáncreas se determinó la concentración de proteínas (Bradford, 1976) glucógeno, lactato, glucosa y triglicéridos (Racotta y Hernández-Herrera, 2000).

## 7.1. Métodos analíticos

### Hemocianina (Hc)

La concentración de hemocianina se determinó a partir del plasma que se obtuvo de la centrifugación de la hemolinfa a 1300 X g por 10 minutos a 4 °C. A continuación se realizó una dilución del plasma 1:20 con solución isotónica de crustáceos (SIC: NaCl 450 mM y KCl 10 mM por litro). Posteriormente, las muestras fueron colocadas en celdas de 1 ml y estas a su vez en un espectrofotómetro para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 335 nm. La concentración se calculó de acuerdo al coeficiente de extinción ( $E_{1\%}$ ) de 2.83 de una solución de hemocianina al 1% (o 10 mg mL<sup>-1</sup>) en una fotocelda de 1 cm (Chen et al., 1994; Racotta y Hernández-Herrera, 2000) de la siguiente manera:

$$\text{Conc mg mL}^{-1} = (\text{abs} * \text{Factor de dilución} * 10) / 2.83$$

La absorbancia es la obtenida a partir de la dilución y el factor 10 se utilizó para que la concentración quedara expresada en mg de hemocianina por ml de hemolinfa.

### Glucosa (Glu)

Para medir glucosa, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX método GOD-PAP). El método se basa en la oxidación enzimática de la glucosa en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar un indicador de quinoneimina dando un colorante rojo violeta (absorbancia máxima a 490 nm) que es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra y que fue calculada a partir de una curva tipo con estándares de 12.5, 5, 50 y 100 mg dL<sup>-1</sup>.

Para los análisis se extrajeron 20 µL de hemolinfa, extracto crudo de músculo o hepatopáncreas y estándares que se colocaron en el fondo de una microplaca, se le agregó 200 µL de solución reactiva, se incubaron 30 minutos y se leyeron en un lector de microplacas BIO-RAD 550 a una absorbancia de 490 nm.

### **Lactato (Lac)**

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

Para los análisis se extrajeron 20 µL de hemolinfa y estándares que se colocaron en el fondo de una microplaca (se realizaron pruebas precedentes con algunas muestras para observar si era necesario realizar diluciones con ácido tricloroacético (TCA por sus siglas en inglés) solo en los casos en los que la concentración de lactato fue muy alta), se le agregaron 200 µL de solución reactiva, se incubaron 10 minutos y se leyeron en un lector de microplacas BIO-RAD 550 a una absorbancia de 540 nm.

Para los análisis de lactato en músculo y hepatopáncreas, se tomaron 0.3 mL del extracto crudo de cada muestra y se mezclaron con 0.3 mL de TCA al 20 % en tubos eppendorf, con la finalidad de precipitar proteínas que interfirieron en la medición. Los tubos se centrifugaron a 3600 rpm por 10 minutos a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Eppendor 5810 R). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios. Posteriormente se extrajeron 20µL y estándares que se colocaron en el fondo de una microplaca, se le agregaron 200µL de solución reactiva, se incubaron 10 minutos y se leyeron en un lector de microplacas BIO-RAD 550 a una absorbancia de 540 nm.

### **Triglicéridos (TG)**

Para triglicéridos, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX, No. catálogo TR 1697). Los triglicéridos se determinaron a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoineimina formada por peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, bajo la influencia de una peroxidasa y fue calculada a partir de una curva tipo con estándares de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg dl<sup>-1</sup> de triglicéridos.

Se extrajeron 20  $\mu\text{L}$  de hemolinfa, extracto crudo de músculo o hepatopáncreas y/o estándares se colocaron en una microplaca, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva, se incubaron 10 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas (Termo Multiskan spectrum) a una absorbancia de 540 nm.

### **Proteínas Totales (PT).**

Para determinar las proteínas de las muestras, se utilizó el método de Bradford (1976). Este se basa en la reacción de los grupos amino libres con el azul Cromassie en presencia de ácido fosfórico y metanol. El complejo formado por la proteína y el colorante provoca un desplazamiento en la absorción máxima del colorante desde 465 a 595 nm. La absorción es proporcional a la concentración de proteína de manera lineal desde 1  $\mu\text{g}$  a 140  $\mu\text{g}$  usando una solución reactiva comercial (BioRad #500-0006).

Con muestras líquidas se hizo una dilución 1 a 100, para hemolinfa, usando agua destilada, posteriormente se agregó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra diluida en un pozo de microplaca y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva de Bradford.

Para muestras de tejidos, se utilizó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del homogeneizado la cual fue diluida con 90  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1N durante 120 minutos, posteriormente se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la dilución, se pusieron en un tubo de vidrio limpio y se agregó un mililitro de reactivo de Bradford, se deja la reacción 5 minutos y se leyó en un espectrofotómetro BIO-RAD 550 a una absorbancia de 595 nm.

Se utilizó una solución estándar con una concentración de 2  $\text{mg ml}^{-1}$  de albúmina bovina, la cual se diluyó en proporción 1:2 en solución salina hasta tener concentraciones, de 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125  $\text{mg ml}^{-1}$  de proteína y solución salina como blanco.

### **Glucógeno (GCG)**

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

se centrifugaron a 3600 rpm por 10 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Eppendor 5810 R). Se recuperó el sobrenadante en tubos limpios.

El glucógeno se determinó por el método de antrona, (Van Handel, 1965), para muestras pequeñas.

Para la extracción de glucógeno del sobrenadante de TCA, se tomaron 0.1 ml del sobrenadante de cada muestra, se le añadieron 2 ml de etanol para precipitar el glucógeno. Las muestras se centrifugaron a 3600 rpm y se eliminó todo el etanol, con pipeta y se evaporó en un horno-estufa (VWR-Sheldon Manufacturing 1350FM) a 70 °C, una vez hecho lo anterior se resuspendió el glucógeno con 0.1 ml de agua destilada. Posteriormente, a cada tubo de muestra y de la curva tipo, se le agregaron 1 ml de solución de antrona 0.1 % diluida en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 %. Las preparaciones anteriores se calentaron a 90 °C a baño María durante 5 minutos. Por último, se enfriaron, también a baño María, y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 620 nm.

Curva tipo: La solución estándar de glucógeno contiene 5 mg ml<sup>-1</sup>, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500 µl de TCA, quedando concentraciones de 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg ml<sup>-1</sup> de glucógeno.

## **7.2. Carga energética (niveles de ATP, ADP, AMP y Arg-P)**

Se utilizó el protocolo implementado por Moal et al. (1989b) para la medición de nucleótidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con base a un serie de estandarizaciones previas (LeCoz, 1989) y adecuaciones recientes a las condiciones del CIBNOR (Racotta, 2008). Y se utilizó el protocolo implementado por Viant et al., (2001) para la medición de Arg-P por HPLC.

### **Homogenización y extracción de nucleótidos y Arginin Fosfato en músculo y hepatopáncreas**

Se obtuvo un extracto de músculo del primer segmento abdominal sin exoesqueleto y sin descongelarse, este se homogenizó en un homogenizador criogénico (MM400) (2 min a

25 rpm): El polvo criogénico obtenido se colocó en papel aluminio, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento.

Se disectó el hepatopáncreas sobre una placa de metal enfriada en nitrógeno líquido o en  $\text{CO}_2$  y se pesó (100 a 150 mg), fue colocado sobre un tubo de ensayo con de TCA 0.5 M frío y procesado tal como se indica a continuación para el músculo.

En caso del músculo, el polvo fue pesado (100 a 150 mg) y colocado en ácido tricloroacético (1.5 ml TCA 0.5M) frío. Las muestras, tanto de músculo como de hepatopáncreas, fueron homogenizadas en un polytron Sentry por 30 s a 2000 rpm en tubo de ensayo (13 x 100 mm) y centrifugadas a 3000 g por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperaron 0.5 ml del sobrenadante que fue neutralizado con 1.3 ml de una mezcla de trioctilamina y diclorometano (1:5), agitándose con vortex 30 s.

Se volvió a centrifugar (5 min a 2000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ ), se midió el pH, el cual no debe ser menor a 6; en caso contrario agregar una proporción mayor de la mezcla para neutralizar con respecto a la muestra .Se recuperaron 4 alícuotas de 50 ml que se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la cuantificación posterior de nucleótidos y fosfato de arginina por HPLC.

### **Condiciones de HPLC para nucleótidos**

La cuantificación se realizó por HPLC de fase reversa utilizando una columna Hyperclone ODS (C18)  $3\ \mu\text{m}$  150 x 4.6 mm (PHENOMENEX No. Cat 00F-4356-EO), utilizando una fase móvil 0.15 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.003 M de tetrabutilamonio, al 8% de metanol y ajustado a pH de 6 con NaOH 5 N, el tiempo de corrida fué de 20 min a un flujo de 0.8 mL/min. Se utilizó un detector UV con una longitud de onda fija de 254 nm.

### **Condiciones de HPLC para Arg-P**

La cuantificación se realizó por HPLC de fase reversa utilizando una columna SphereClone  $\text{NH}_2$  O  $5\ \mu\text{m}$  250 x 4.6 mm, marca PHENOMENEX , utilizando una fase móvil 20 mM de  $\text{K H}_2 \text{PO}_4$  (pH 2.6)- acetonitrilo (72:28), el tiempo de corrida fué de 20 min a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó un detector UV con una longitud de onda fija de 205 nm.

### 7.3 Preparación de estándares

#### Nucleótidos

Se preparó una solución madre de cada nucleótido (ATP, ADP, AMP GTP y GDP) en una concentración aproximada de  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  (ver Tabla II) utilizando agua miliQ. A partir de esta se realizó una dilución 1:100 con buffer (fase móvil) obteniéndose así una solución diluida de cada nucleótido de  $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ . Posteriormente se realizó una mezcla de nucleótidos a partir de estas soluciones diluidas de acuerdo a la Tabla II. Para finalizar se alicuotaron  $100 \text{ } \mu\text{l}$  de la mezcla anterior en viales ámbar y se almacenaron a  $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$ , esto viales son los que se inyectan en cada corrida.

**Tabla II. Cantidad inyectada (nmoles en  $25 \text{ } \mu\text{l}$ ) de los diferentes nucleótidos**

Nucleótido	Peso molecular <sup>1</sup>	Sol. madre (mg/10 ml) <sup>2</sup>	Vol. usado para la mezcla( $\mu\text{l}$ )	nmoles en $25 \text{ } \mu\text{l}$ inyectados <sup>2</sup>
<b>ATP</b>	590.1	5.2/6.0	200	0.055/0.063
<b>ADP</b>	487.9	5.2/4.7	200	0.065/0.058
<b>AMP</b>	460.9	5.8/5.1	200	0.078/0.068
<b>GTP</b>	624.1	5.3/5.6	100	0.030/0.027
<b>GDP</b>	553.1	5.1/6.8	100	0.035/0.037

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

<sup>2</sup> Se analizaron las muestras en dos fechas diferentes con estándares ligeramente distintos en concentración.

#### Arg-P

Se disolvieron  $5 \text{ mg}$  en  $1 \text{ ml}$  de agua deionizada, a partir de esta solución madre se tomaron  $6.4 \text{ ml}$  y se llevaron a  $200 \text{ ml}$  de aquí se realizaron diluciones 1:2, utilizándose el punto 2 de la curva (Tabla III).

**Tabla III. Cantidad inyectada ( $\mu$ moles en 25  $\mu$ l) de L-Arg-P.**

<b>Estándar</b>	<b><math>\mu</math>moles</b>
<b>L-Arg-P</b>	0.0061
<b>L-Arg</b>	0.00166

#### **7.4. Análisis estadísticos**

Se verifico la normalidad y homogeneidad de varianzas para realizar ANOVA o T-student, de cada bioensayo. En caso de no cumplirse estos dos supuestos, se aplicaron transformaciones de los datos.

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Experimento I: Alimentados vs. Ayunados**

No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los dos grupos para ninguna de las variables analizadas en los tres tejidos (tabla IV). Las únicas variables que tendieron a ser ligeramente más altas en camarones alimentados fueron los triglicéridos en hemolinfa y hepatopáncreas, así como todas las variables analizadas en músculo. Para las variables en hemolinfa, podemos mencionar un promedio global de  $3.83 \text{ mg dl}^{-1}$  para los niveles de lactato,  $15.5 \text{ mg dl}^{-1}$  para glucosa,  $71.8 \text{ mg dl}^{-1}$  para triglicéridos,  $183 \text{ mg ml}^{-1}$  para proteínas y  $88.1 \text{ mg ml}^{-1}$  para hemocianina. Además de las tendencias no significativas ya mencionadas, los aspectos más relevantes a mencionar son una mayor concentración de proteínas en músculo que en hepatopáncreas, mientras que las reservas de carbohidratos (glucógeno y glucosa libre) son mayores en hepatopáncreas. Sin embargo, los niveles de lactato son menores en este órgano comparado con el músculo.

**Tabla XXI. Promedios de las variables metabólicas determinadas en *Litopenaeus vannamei* del experimento I. (Media  $\pm$  E.S.).**

<b>Hemolinfa</b>		
<b>Metabolito</b>	<b>Ayuno</b>	<b>Alimentados</b>
<b>Proteínas totales mg mL<sup>-1</sup></b>	188.32 $\pm$ 6.8	177.46 $\pm$ 3.59
<b>Lactato mg dl<sup>-1</sup></b>	3.81 $\pm$ 0.5	3.86 $\pm$ 0.43
<b>Glucosa mg dl<sup>-1</sup></b>	15.10 $\pm$ 2.2	15.68 $\pm$ 1.08
<b>Triglicéridos mg dl<sup>-1</sup></b>	66.23 $\pm$ 6.6	77.45 $\pm$ 13.55
<b>Hemocianina mg ml<sup>-1</sup></b>	85.94 $\pm$ 5.4	90.32 $\pm$ 7.1
<b>Hepatopáncreas</b>		
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	127.79 $\pm$ 7.60	134.15 $\pm$ 10.98
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	0.80 $\pm$ 0.09	0.67 $\pm$ 0.06
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	18.46 $\pm$ 1.14	17.84 $\pm$ 0.95
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	5.18 $\pm$ 0.75	5.22 $\pm$ 0.80
<b>Triglicéridos mg g<sup>-1</sup></b>	33.43 $\pm$ 4.02	39.12 $\pm$ 2.86
<b>Músculo</b>		
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	201.46 $\pm$ 22.81	224.47 $\pm$ 11.56
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	1.86 $\pm$ 0.18	2.23 $\pm$ 0.27
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	3.53 $\pm$ 0.47	4.73 $\pm$ 0.15
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	1.57 $\pm$ 0.43	2.47 $\pm$ 0.49

\*En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la prueba de T-student.

## 8.2. Experimentos en estanques litorales

Antes de presentar los datos de cada muestreo en fechas particulares es importante hacer una comparación para los valores del grupo capturado con atarraya sin sedación para las distintas fechas dado que hubo diferencias importantes. Se considera en particular dicho grupo por las siguientes razones i) es el único grupo que fue considerado en todos los muestreos, ii) representa la condición en la cual se han obtenido datos en trabajos anteriores, iii) representa una respuesta de estrés para lo cual se está buscando, como objetivo del presente trabajo, una alternativa práctica para atenuar dicha respuesta.

Como se mencionó en la sección de Material y Métodos, los muestreos se realizaron del 2 al 30 de Octubre, las diferencias más importantes entre los distintos muestreos son, entre otras, las condiciones particulares del estanque, particularmente oxígeno y temperatura y la proporción de los organismos en los distintos estadios de muda, aunque se descartaron, durante el muestreo, los organismos a punto de mudar (estadios D2 a D4) o recién mudados (estadio A a B). Se puede apreciar que 44 al 64 % de los organismos se encontraban en intermuda (estadio C). En caso del 2, 13 y 30 de Octubre, los organismos se encontraban ligeramente en mayor proporción en el estadio de intermuda C, mientras que para el 9 y 19 de Octubre se encontró un 54 a 56 % de organismos en estadios de premuda D0-D1 y el restante en C. Al comparar dentro de muestreos los valores obtenidos para ambos estadios de muda, solo se encontraron diferencias significativas para glucosa el día 2 de Octubre (estadio C:  $40.3 \pm 2.9$  mg dl<sup>-1</sup> vs. estadio D0-D1:  $59.4 \pm 6.7$  mg dl<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ), hemocianina el día 2 de Octubre (estadio C:  $94.5 \pm 2.3$  mg ml<sup>-1</sup> vs estadio D0-D1:  $101.9 \pm 1.9$  mg ml<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ) y triglicéridos el día 30 de Octubre (estadio C:  $71.9 \pm 5.8$  mg dl<sup>-1</sup> vs estadio D0-D1:  $104.5 \pm 14.6$  mg dl<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ).

**Tabla XXII. Porcentaje de organismos en distintos estadios de muda para cada fecha de muestreo. Se consideraron únicamente lo organismos capturados con atarraya.**

Muestreo	C (%)	D0-D1 (%)	D2-D3 (%)
02-oct	60	30	10
09-oct	43.7	56.3	-
13-oct	54.5	45.5	-
19-oct	46.1	53.9	-
30-oct	63.6	36.4	-

Por otro lado es importante considerar las condiciones de oxígeno y temperatura del estanque a lo largo de las distintas fechas de muestreo las cuales se muestran en la Tabla VI.

**Tabla XXIII. Valores iniciales de oxígeno y temperatura en estanque y tina.**

	<b>02-oct-10</b>	<b>09-oct-10</b>	<b>13-oct-10</b>	<b>19-oct-10</b>	<b>30-oct-10</b>
<b>Hora de Inicio</b>	8:44a.m.	08:30 a.m.	8:30a.m.	08:40 a.m.	08:55a.m
<b>O<sub>2</sub> mg L<sup>-1</sup></b>	2.27 (E)	3 (E)	2.9 (E)	4.58 (E)	4.81 (E)
<b>T°C</b>	27.8 (E)	4.1 (T) 27.8 (E)	26.8 (E)	24.4 (E)	25.3 (E)
		26.8 (T)			

(E)= estanque y (T)= Tinas.

El primer muestreo del 2 de Octubre se hizo dentro de las condiciones consideradas como normales para el estanque, aunque los niveles matutinos de oxígeno fueron relativamente bajos de 2.3 mg L<sup>-1</sup> con temperatura de 27.8 °C (Tabla VI). El día 5 de octubre ocurrió un evento de baja de oxígeno en todo el estanque (niveles < 0.5 mg L<sup>-1</sup>) y ocasionó la muerte de muchos organismos. Después de cuatro días de dicho evento (9 de Octubre), se realizó el segundo muestreo, los datos obtenidos están relacionados con una situación post-estrés crónico, aunque para ese día el nivel de oxígeno ya se había restablecido (3 mg L<sup>-1</sup>). Posteriormente los muestreos del los días 13 y 19 de Octubre en principio fueron equivalentes al 2 de Octubre aunque los niveles de oxígeno fueron mayores y la temperatura menor en caso del 19 de Octubre (4.6 mg L<sup>-1</sup> y 24.4 °C, respectivamente), Finalmente, el día 30 de Octubre nuevamente representó una situación anómala dado que la población del estanque se encontraba considerablemente disminuida lo que implicó el uso de la panga para ir a capturar los animales con lo cual transcurrieran 30 minutos más desde la captura hasta el muestreo del primer organismo.

El patrón general para todas las variables en hemolinfa, excepto para proteínas, fue una disminución significativa para el día 9 de Octubre posterior al evento de hipoxia. Las disminuciones más marcadas fueron para los niveles de glucosa y lactato con un 72 % y 78 %, respectivamente y en menor grado para triglicéridos y hemocianina con 37.5 % y 22%, respectivamente. (Fig. 5, 6, 7 y 8). Entre el 9 y el 30 de Octubre se observa cierta recuperación de los niveles iniciales obtenidos el día 2 de Octubre. Así la glucosa incrementa progresivamente hasta el 30 de Octubre hasta alcanzar 42 mg dl<sup>-1</sup> (Fig. 5). En el caso del lactato, el patrón es ligeramente diferente con los niveles más altos el 2 de Octubre

(44 mg dl<sup>-1</sup>), los más bajos entre el 9 y el 13 de Octubre (9.6 y 11.9 mg dl<sup>-1</sup>) seguido de una recuperación parcial a niveles intermedios (26.7 y 29.1 mg dl<sup>-1</sup>) (Fig. 6). Para triglicéridos, después de la disminución inicial el 9 de Octubre, hay un aumento progresivo hasta alcanzar niveles de 84 mg dl<sup>-1</sup> que son, incluso ligera pero no significativamente, mayores que los del 2 de Octubre (Fig. 7). Finalmente, el patrón de la hemocianina es similar al del lactato, con los valores más bajos entre los días 9 y 13 de Octubre y una recuperación parcial para los días 19 y 30 de Octubre (Fig. 8).

Las proteínas presentaron un patrón muy diferente en el cual no existe variación significativa entre el 2 y el 9 de octubre (134.7 a 125.5 mg ml<sup>-1</sup>) pero si un incremento significativo el 13 de Octubre a los valores más altos (199.8 mg ml<sup>-1</sup>) seguido de una nueva disminución el 19 de Octubre, para terminar con niveles intermedios (162.2 mg ml<sup>-1</sup>) (Fig. 9).

Al considerar intervalos de los niveles de las distintas variables de otros trabajos en tanques al exterior con cierta productividad natural y en los cuales la captura se realiza con una red de cuchara, se aprecia que son principalmente los niveles de glucosa y lactato los que están muy por arriba del rango reportado en estos trabajos previos (Fig. 5 y 6).

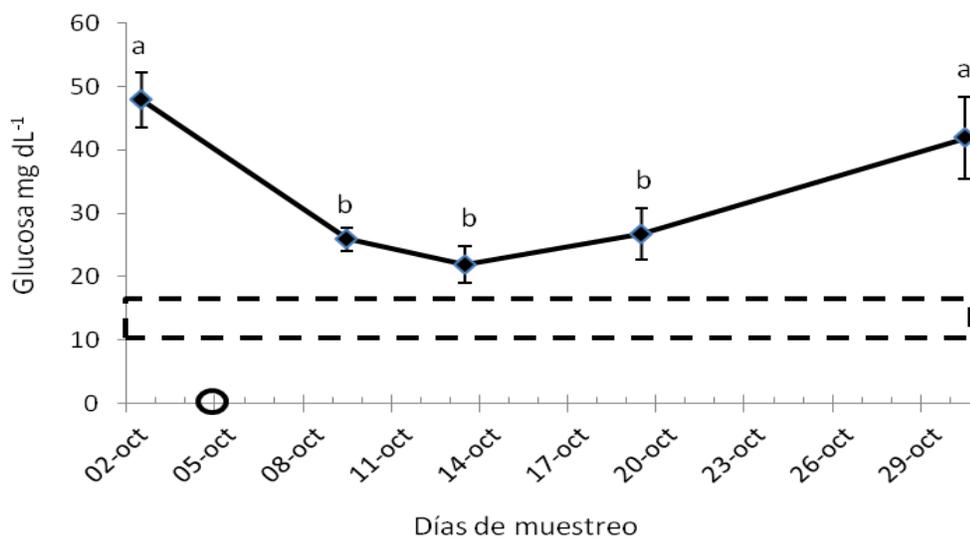


Figura 27.- Valores de glucosa en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. En el día 5-octubre (O) ocurrió un evento de hipoxia severa en el estanque. El intervalo enmarcado con la línea punteada muestra un rango a la cual pertenecen valores obtenidos en tanques de concreto al exterior

en camarones en condiciones basales en las cuales se considera que no hubo o fue mínimo el estrés por captura. Datos basados en (Mercier et al., 2009; Aparicio-Simón et al., 2010; Aguilar et al., 2012).

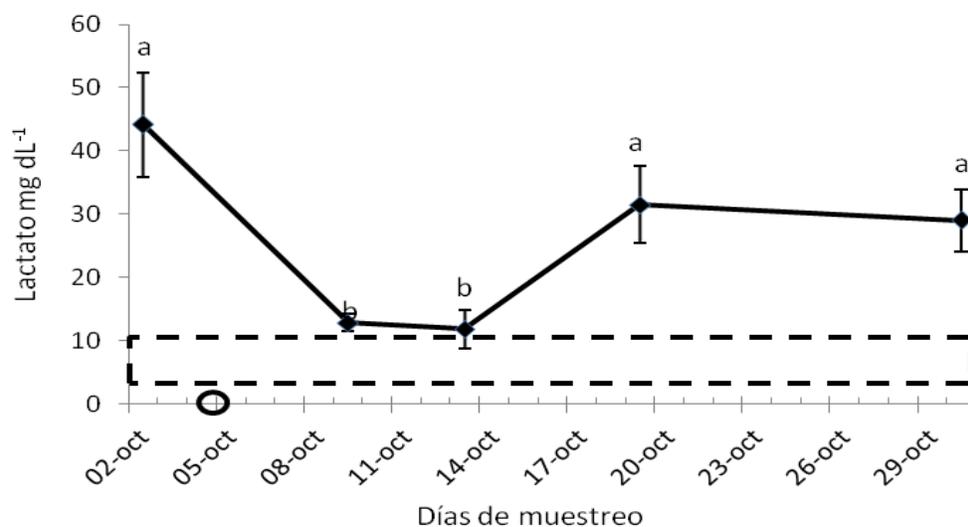


Figura 28.- Valores de lactato en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. Ver Figura 5 para más detalles.

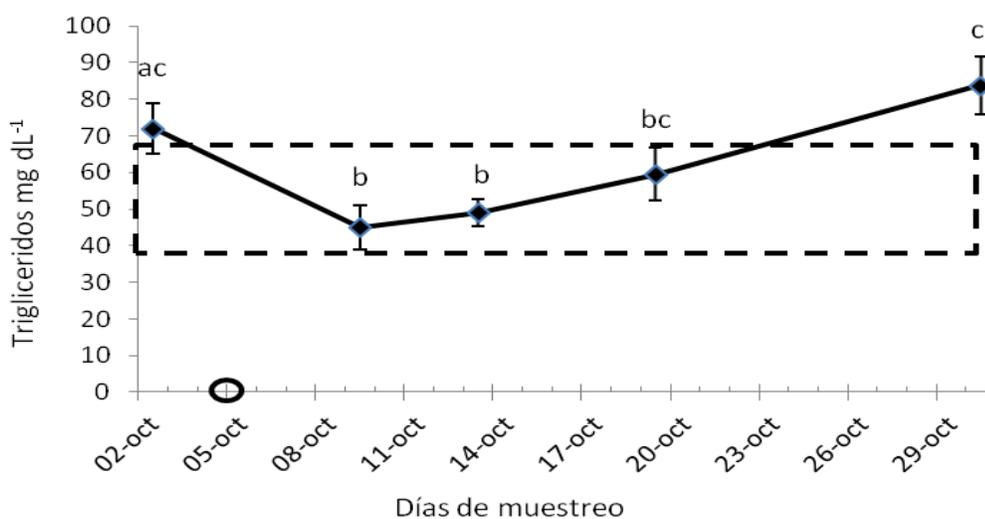


Figura 29.- Valores de triglicéridos en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. Ver Figura 5 para más detalles.

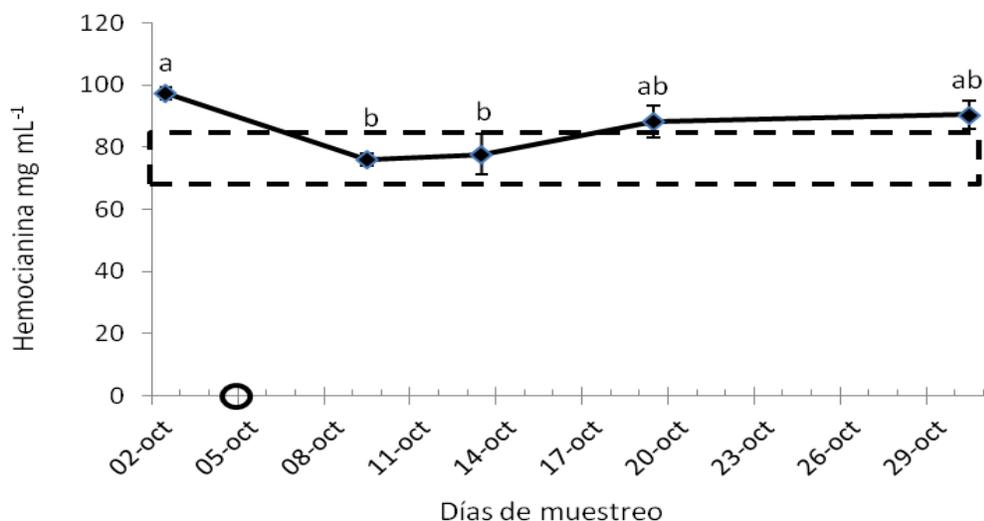


Figura 30.- Valores de hemocianina en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. Ver Figura 5 para más detalles.

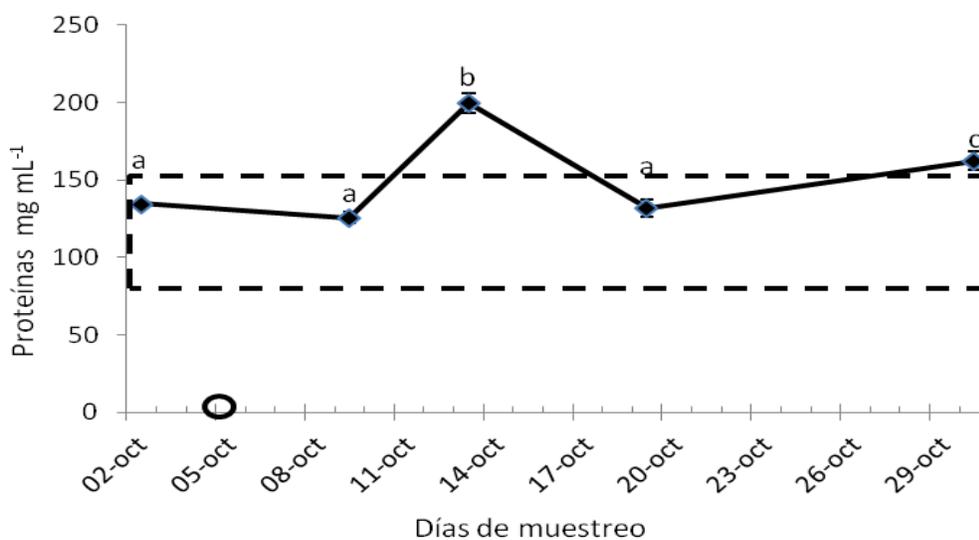


Figura 31. Valores de proteína en hemolinfa, en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación. Ver Figura 5 para más detalles.

Un patrón similar de una disminución en prácticamente todas las variables metabólicas para el 9 de Octubre se observó también para hepatopáncreas y músculo. En hepatopáncreas, la disminución fue significativa para todas las variables, excepto para glucógeno en comparación con el resto de los muestreos, con un 53 % para proteínas, 79 % para lactato, 67 % para glucosa y 75 % para triglicéridos. En todos los casos, los niveles de

estas variables comenzaron a incrementarse a partir del 13 de Octubre hasta alcanzar, el día 30 de Octubre, niveles ligeramente inferiores para proteínas, similares para triglicéridos o inclusive significativamente superiores en caso de la glucosa y el lactato con respecto a los valores iniciales del 2 de Octubre.

**Tabla XXIV. Variables metabólicas en hepatopáncreas en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación.**

Metabolito	Hepatopáncreas				
	2-oct	9-oct	13-oct	19-oct	30-oct
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	172.05±11.37 <sup>b</sup>	80.68±7.83 <sup>a</sup>	94.85±8.24 <sup>a</sup>	105.27±9.24 <sup>a</sup>	136.52±10.84 <sup>b</sup>
<b>Lactato</b>	1.09±0.22 <sup>b</sup>	0.23±0.05 <sup>a</sup>	0.56±0.11 <sup>ab</sup>	0.81±0.19 <sup>ab</sup>	1.97±0.31 <sup>c</sup>
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	12.49±1.39 <sup>b</sup>	4.14±0.93 <sup>a</sup>	7.59±1.47 <sup>a</sup>	7.53±1.87 <sup>a</sup>	21.42±2.67 <sup>c</sup>
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	6.33±1.11 <sup>ab</sup>	3.88±0.40 <sup>a</sup>	6.20±0.84 <sup>ab</sup>	8.49±1.24 <sup>b</sup>	6.90±0.81 <sup>ab</sup>
<b>Triglicéridos mg g<sup>-1</sup></b>	39.02±4.13 <sup>c</sup>	9.68±2.41 <sup>a</sup>	23.11±4.71 <sup>b</sup>	25.36±4.75 <sup>b</sup>	39.66±2.33 <sup>c</sup>

En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la prueba de Newman-Keuls a partir de la cual medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

En músculo, la única variable no afectada significativamente fue el nivel de proteína total. Para las demás variables y a diferencia de la hemolinfa y el hepatopáncreas, si bien hubo una disminución el día 9 de Octubre, el patrón de recuperación fue diferencial para las distintas variables. En caso del lactato, la disminución del 9 de Octubre fue del 51 % y la recuperación se observó desde el 13 de Octubre. La glucosa disminuyó en un 72 % y después presentó cierta variación no significativa hasta alcanzar, el 30 de Octubre, niveles significativamente menores en un 37 % comparado con los valores iniciales del 2 de Octubre. Finalmente, el glucógeno disminuyó en un 91 % el 9 de Octubre, después de lo cual incremento no significativamente hasta el 30 de Octubre, alcanzado niveles 56 % menores con respecto a los niveles iniciales del 2 de Octubre.

**Tabla XXV. Variables metabólicas en hepatopáncreas en las diferentes fechas de muestreo, solo para la condición de captura con atarraya sin sedación.**

Metabolito	Músculo				
	2-oct	9-oct	13-oct	19-oct	30-oct
<b>Proteínas totales</b> <b>mg g<sup>-1</sup></b>	228.55±13.8	182.16±11.1	210.87±18.7	185.59±14.0	234.28±13
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	2.48±0.33 <sup>b</sup>	1.22±0.21 <sup>a</sup>	2.09±0.25 <sup>b</sup>	2.42±0.27 <sup>b</sup>	2.71±0.19 <sup>b</sup>
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	5.73±0.59 <sup>c</sup>	1.56±0.42 <sup>a</sup>	3.02±0.64 <sup>ab</sup>	1.56±0.34 <sup>a</sup>	3.61±0.38 <sup>b</sup>
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	3.56±0.77 <sup>a</sup>	0.32±0.11 <sup>b</sup>	0.98±0.23 <sup>b</sup>	0.77±0.19 <sup>b</sup>	1.55±0.21 <sup>b</sup>

En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la prueba de Newman-Keuls a partir de la cual medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

### 8.3. Experimento I: captura con atarraya sin sedación vs. atarraya con eugenol (2-octubre-2010)

Los resultados obtenidos en hemolinfa para este experimento no presentaron diferencias significativas en el uso del eugenol posterior a la captura con atarraya, en ninguna de las variables analizadas en los tres tejidos (Tabla IX). Sin embargo, en hemolinfa los niveles de lactato, indican una tendencia a valores mayores si no se utiliza eugenol (44.14 mg dL<sup>-1</sup> para condición sin sedación y 33.24 mg dL<sup>-1</sup> para eugenol). Por el contrario, los valores de glucosa si son similares para ambos grupos con un promedio de 48 mg dL<sup>-1</sup>.

La ligera disminución de lactato en hemolinfa en los camarones tratados con eugenol también se observó en músculo y hepatopáncreas, siendo estadísticamente significativa en este último (Tabla IX). El resto de los metabolitos (proteínas, triglicéridos y glucógeno) en los tres tejidos no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, el glucógeno muscular si presenta un disminución cuantitativamente importante de un 47 % en el grupo tratado con eugenol comparado con el grupo sin anestesia.

**Tabla XXVI. Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de *L. vanammei* (Media±E.S.) del muestreo 2-octubre-2010.**

<b>Hemolinfa</b>		
<b>Metabolito</b>	<b>Sin sedación</b>	<b>Eugenol</b>
<b>Proteínas totales mg mL<sup>-1</sup></b>	134.67±1.42	131.60±2.34
<b>Lactato mg dL<sup>-1</sup></b>	44.14±8.20	33.24±6.30
<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>	47.92±4.31	49.82±3.62
<b>Triglicéridos mg dL<sup>-1</sup></b>	72.01±6.89	80.15±8.04
<b>Hemocianina mg mL<sup>-1</sup></b>	97.46±1.91	90.18±3.05
<b>Hepatopáncreas</b>		
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	172.05±11.37	142.63±16.4
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	1.09±0.22*	0.57±0.10*
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	12.49±1.39	8.62±1.41
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	6.33±4.13	5.91±4.75
<b>Triglicéridos mg g<sup>-1</sup></b>	39.02±1.11	27.32±0.82
<b>Músculo</b>		
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	228.55±13.85	226.74±7.26
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	2.48±0.33	2.18±0.22
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	5.73±0.59	5.15±0.54
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	3.56±0.77	1.87±0.26

\*En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de T-student. (P< 0.05).

**Tabla XXVII. Valores de oxígeno y temperatura en la condición atarraya sin sedación y atarraya con eugenol a lo largo del muestreo.**

<b>2 octubre 2010</b>			
<b>Hora</b>	<b>9:09 a.m.</b>	<b>09:17 a.m.</b>	<b>9:22a.m.</b>
<b>O<sub>2</sub> mg Lt<sup>-1</sup></b>	1.52 (E)	3.2 (E)	4.2 (E)
	2.7 (A)	4.02 (A)	4.3 (A)
<b>T°C</b>	27.8	-	-

(E) = eugenol, (A) = Atarraya sin sedación.

#### **8.4. Experimento II: Atarraya sin sedación vs. Canastas vs. Tina, del muestreo 09-octubre-2010**

En hemolinfa el lactato es significativamente mayor en la condición de captura con atarraya ( $9.6 \text{ mg dL}^{-1}$ ) en comparación con la condición de aislamiento previo en canastas y tina ( $2.7$  y  $3.0 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectivamente) (Tabla XI). En los niveles de glucosa, proteínas y triglicéridos en hemolinfa, no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos (tabla XI). En la hemocianina, se presentaron niveles significativamente mayores en los camarones en tinas comparados con los de canastas y valores intermedios para los organismos capturados con atarraya (Tabla XI).

En hepatopáncreas, los niveles de lactato y de glucosa fueron significativamente mayores en los camarones separados el día anterior en la tina en comparación con los camarones del estanque independientemente si fueron capturados con atarraya o aislados previamente en canastas (Tabla XI). No se observaron diferencias significativas para el resto de las variables del hepatopáncreas aunque los valores más altos de proteínas y triglicéridos se registraron para los organismos de la tina. En cuanto a proteínas se pudo observar que la concentración en músculo en la condición atarraya es significativamente menor que para canastas y tinas (Tabla XI).

**Tabla XXVIII. Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de *L. vanammei* (Media  $\pm$  E.S.) del muestreo 9-octubre-2010.**

<b>Hemolinfa</b>			
<b>Metabolito</b>	<b>Sin sedación</b>	<b>Canastas</b>	<b>Tina</b>
<b>Proteínas totales mg mL<sup>-1</sup></b>	125.51 $\pm$ 3.5	121.88 $\pm$ 6.2	136.92 $\pm$ 3.8
<b>Lactato mg dL<sup>-1</sup></b>	9.61 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>	2.71 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	3.0 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>
<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>	13.23 $\pm$ 1.84	10.76 $\pm$ 1.18	14.73 $\pm$ 0.97
<b>Triglicéridos mg dL<sup>-1</sup></b>	45.03 $\pm$ 6.02	41.53 $\pm$ 4.58	51.68 $\pm$ 3.46
<b>Hemocianina mg mL<sup>-1</sup></b>	76.2 $\pm$ 1.97 <sup>ab</sup>	69.74 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>	81.74 $\pm$ 2.53 <sup>b</sup>
<b>Hepatopáncreas</b>			
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	80.68 $\pm$ 7.8	99.89 $\pm$ 6.8	104.98 $\pm$ 7.2
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	4.14 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	5.10 $\pm$ 0.85 <sup>ab</sup>	9.28 $\pm$ 1.34 <sup>b</sup>
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	3.88 $\pm$ 0.40	3.70 $\pm$ 0.56	3.71 $\pm$ 0.27
<b>Triglicéridos mg g<sup>-1</sup></b>	9.68 $\pm$ 2.41	14.24 $\pm$ 3.57	21.63 $\pm$ 3.18
<b>Músculo</b>			
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	182.16 $\pm$ 11.2 <sup>a</sup>	226.21 $\pm$ 15.1 <sup>b</sup>	228.34 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	1.22 $\pm$ 0.21	1.14 $\pm$ 0.20	1.42 $\pm$ 0.18
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	1.56 $\pm$ 0.42	2.42 $\pm$ 0.57	2.91 $\pm$ 0.44
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	0.32 $\pm$ 0.11	0.74 $\pm$ 0.21	0.75 $\pm$ 0.20

En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la prueba de Newman-Keuls a partir de la cual medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

**Tabla XXIX. Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo.**

<b>9 octubre 2010</b>		
<b>Hora</b>	9:35 a.m.	10:44 a.m.
<b>O<sub>2</sub> mg Lt<sup>-1</sup></b>	4.5 (T)	4.4 (T)
	4.4 (A)	5.4 (A)
<b>T°C</b>	27.3	27.4

(T) = Tinas y (A) = Atarraya sin sedación.

### Carga energética adenilica (CEA) y fosfato de arginina (Arg-P)

En cuanto al análisis de muestras para CEA y Arg-P en músculo, se obtuvieron niveles significativamente más bajos para la CEA en la condición atarraya (0.69) con respecto a las condiciones canastas y tina (0.84 y 0.89) (Fig.10). Se presenta el mismo efecto para Arg-P, con una disminución del 85 % para los organismos capturados con atarraya ( $2.55 \mu\text{moles g}^{-1}$ ) comparado con los organismos aislados previamente en canastas ( $16.54 \mu\text{moles g}^{-1}$ ) o tina ( $17.36 \mu\text{moles g}^{-1}$ ). (Fig. 11).

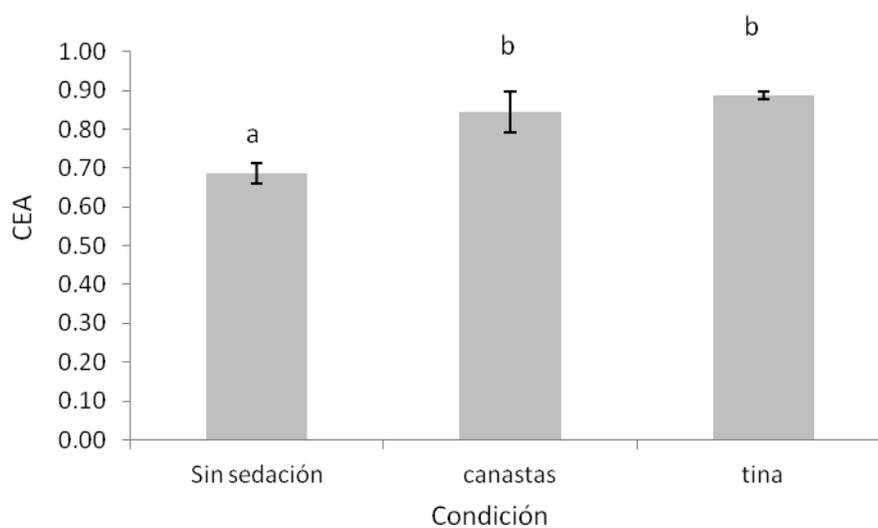


Figura 32.- Valores de CEA en músculo de *L. vanammei* sometidos a distintas condiciones de muestreo.

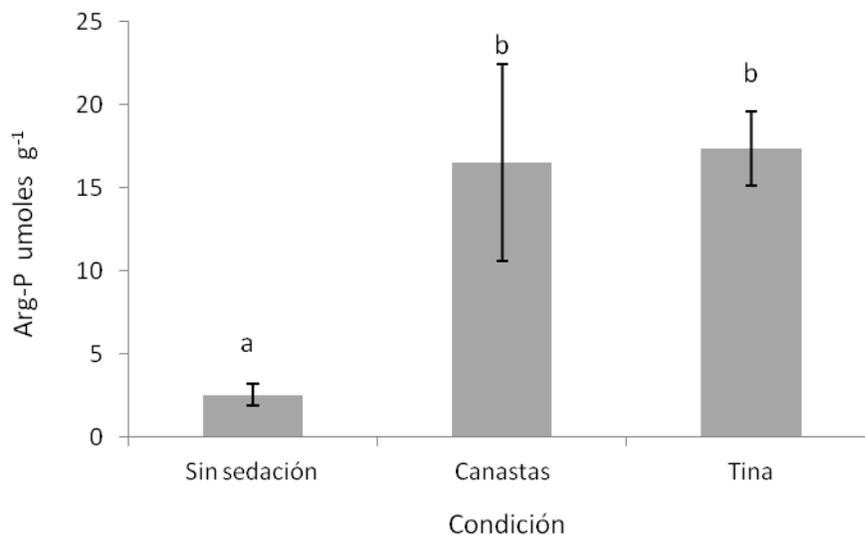


Figura 33.- Valores de Arg-P en músculo de *L. vanammei* sometidos a distintas condiciones de muestreo.

### 8.5. Experimento III: atarraya sin sedación vs. atarraya con hipotermia, del muestreo del 13-octubre-2010

No se encontraron diferencias significativas entre los tres tejidos y para todas las variables analizadas (Tabla XIII). Aun cuando la diferencia no haya sido significativa, es importante señalar que los niveles de lactato y de glucosa en hemolinfa fueron 60 % y 24 % mayores, respectivamente, en los camarones sometidos a hipotermia posterior a la captura. La misma tendencia pero en menor grado se puede observar para los niveles de lactato y glucosa en el hepatopáncreas pero no para músculo.

**Tabla XXX. Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de *L. vanammei* (Media  $\pm$  E.S.) del muestreo 13-octubre-2010.**

<b>Hemolinfa</b>		
<b>Metabolito</b>	<b>Sin sedación</b>	<b>Hipotermia</b>
<b>Proteínas totales mg mL<sup>-1</sup></b>	199.78 $\pm$ 6.27	186.45 $\pm$ 11.87
<b>Lactato mg dL<sup>-1</sup></b>	11.89 $\pm$ 3.06	19.12 $\pm$ 5.20
<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>	21.86 $\pm$ 2.86	27.13 $\pm$ 4.62
<b>Triglicéridos mg dL<sup>-1</sup></b>	49 $\pm$ 0.04	41 $\pm$ 0.05
<b>Hemocianina mg mL<sup>-1</sup></b>	85.33 $\pm$ 2.82	77.8 $\pm$ 6.62
<b>Hepatopáncreas</b>		
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	94.85 $\pm$ 8.24	95.86 $\pm$ 8.75
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	0.56 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.12
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	7.59 $\pm$ 1.47	9.39 $\pm$ 1.33
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	6.20 $\pm$ 0.84	5.11 $\pm$ 0.84
<b>Triglicéridos mg g<sup>-1</sup></b>	23.11 $\pm$ 4.71	33.16 $\pm$ 4.95
<b>Músculo</b>		
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	210.87 $\pm$ 18.77	205.42 $\pm$ 11.87
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	2.09 $\pm$ 0.25	2.31 $\pm$ 0.24
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	3.02 $\pm$ 0.64	2.73 $\pm$ 0.67
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	0.98 $\pm$ 0.23	0.97 $\pm$ 0.20

\*En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de T-student. (P< 0.05).

**Tabla XXXI. Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo.**

<b>13 octubre 2010</b>		
<b>Hora</b>	<b>08:54 a.m.</b>	<b>09:41 a.m.</b>
<b>O<sub>2</sub> mg Lt<sup>-1</sup></b>	3.9 (H)	4.6 (H)
	4.4 (A)	5.1 (A)
<b>T°C</b>	21.1 (H)	21.4 (H)
	26.6 (A)	26 (A)

(A)= Atarraya sin sedación y (H) = hipotermia.

## **8.6 Experimento IV: atarraya sin sedación vs. atarraya con eugenol vs. atarraya con hipotermia vs. Canastas, del muestreo del 19-octubre-2010**

Al comparar los valores obtenidos de glucosa en hemolinfa se puede observar que los niveles son significativamente menores en un 48 % en los camarones aislados en canastas comparado con los organismos capturados sin sedación o con sedación por eugenol. Los camarones sometidos a sedación por hipotermia presentaron niveles intermedios que no fueron significativamente diferentes con respecto a ninguno de los otros grupos, aunque fueron más cercanos a los camarones de canastas (Tabla XV).

El menor nivel de lactato en hemolinfa se obtuvo con los camarones en canastas y fue significativamente menor en un 90 % en comparación con los camarones capturados con atarraya (Tabla XV). Los niveles intermedios se obtuvieron para camarones con sedación por hipotermia o eugenol y que también fueron significativamente menores en un 70 % y 55 %, respectivamente, con respecto a camarones capturados con atarraya (Tabla XV).

Para proteínas, hemocianina y triglicéridos en hemolinfa no se observaron diferencias significativas entre los cuatro tratamientos.

No se observaron diferencias significativas para las distintas variables en hepatopáncreas. En el caso del músculo, los niveles de lactato son significativamente menores en un 54 %, en promedio, en camarones aislados en canastas con respecto a las otras tres condiciones. (Tabla XV). Finalmente los niveles de proteínas en músculo fueron significativamente mayores en un 21.5 % en el grupo de canastas en comparación con los otros tres grupos.

**Tabla XXXII. Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de *L. vanammei* (Media  $\pm$  E.S.) del muestreo 19-octubre-2010.**

<b>Hemolinfa</b>				
<b>Metabolito</b>	<b>Canastas</b>	<b>Sin sedación</b>	<b>Eugenol</b>	<b>Hipotermia</b>
<b>Proteínas totales mg mL<sup>-1</sup></b>	129.47 $\pm$ 9.3	131.69 $\pm$ 5.9	136.28 $\pm$ 5.8	139.76 $\pm$ 4.7
<b>Lactato mg dL<sup>-1</sup></b>	3.19 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	31.55 $\pm$ 6.12 <sup>b</sup>	14.13 $\pm$ 3.34 <sup>a</sup>	9.47 $\pm$ 2.47 <sup>a</sup>
<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>	14.26 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>	26.69 $\pm$ 4.06 <sup>a</sup>	29.50 $\pm$ 5.16 <sup>b</sup>	17.87 $\pm$ 3.23 <sup>ab</sup>
<b>Triglicéridos mg dL<sup>-1</sup></b>	64 $\pm$ 0.11	60 $\pm$ 0.07	73 $\pm$ 0.10	60 $\pm$ 0.08
<b>Hemocianina mg mL<sup>-1</sup></b>	83.83 $\pm$ 8.5	88.3 $\pm$ 4.9	90.02 $\pm$ 5.67	93.24 $\pm$ 5.00
<b>Hepatopáncreas</b>				
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	121.72 $\pm$ 11.9	105.27 $\pm$ 9.2	119.05 $\pm$ 10.1	115.67 $\pm$ 13.6
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	1.05 $\pm$ 0.22	0.81 $\pm$ 0.19	1.17 $\pm$ 0.27	0.81 $\pm$ 0.19
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	12.92 $\pm$ 2.50	7.53 $\pm$ 1.87	12.52 $\pm$ 2.87	9.19 $\pm$ 2.12
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	7.65 $\pm$ 1.40	8.49 $\pm$ 1.24	11.37 $\pm$ 1.51	12.49 $\pm$ 1.68
<b>Triglicéridos mg g<sup>-1</sup></b>	33.05 $\pm$ 5.51	25.36 $\pm$ 4.75	26.60 $\pm$ 5.69	26.23 $\pm$ 5.67
<b>Músculo</b>				
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	242.37 $\pm$ 13.2 <sup>b</sup>	185.59 $\pm$ 14.0 <sup>a</sup>	198.12 $\pm$ 14.4 <sup>a</sup>	190.86 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	1.07 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	2.28 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	2.55 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	2.40 $\pm$ 0.64	1.56 $\pm$ 0.34	2.61 $\pm$ 0.54	2.32 $\pm$ 0.50
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	1.04 $\pm$ 0.24	0.77 $\pm$ 0.19	1.31 $\pm$ 0.37	0.87 $\pm$ 0.19

En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la prueba de Newman-Keuls a partir de la cual medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

**Tabla XXXIII. Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo.**

<b>19 octubre 2010</b>		
<b>Hora</b>	09:32 a.m.	10:05 a.m.
<b>O<sub>2</sub> mg Lt<sup>-1</sup></b>	3.9 (H).	5.5 (H).
	-	3.9 (A).
	-	5.3 (E).
<b>T°C</b>	19.6 (H).	19.9 (H).
	24.6 (A).	24.9 (A).
	24.6 (E).	24.6 (E).

(A) = Atarraya sin sedación, (H) = Hipotermia y (E) = Eugenol.

### Carga energética adenilica y Arg-P

El valor más bajo de CEA en músculo se obtuvo para la condición de atarraya sin sedación (0.85), que fue significativamente menor que para las condiciones canastas y eugenol (0.92 y 0.95, respectivamente), mientras que para la condición de hipotermia se obtuvo un valor intermedio (0.88) (Fig.12). Para Arg-P, se obtuvieron valores significativamente más altos en los camarones sedados con Eugenol ( $51.5 \mu\text{moles g}^{-1}$ ) en comparación con los otros tres grupos con valores de 20.3, 11.9 y  $13.4 \mu\text{moles g}^{-1}$  para canastas, sin sedación e hipotermia, respectivamente (Fig. 13).

Para hepatopáncreas, la variación en los valores de la CEA entre los distintos tratamientos es menos marcada que para músculo, aunque si se presentan diferencias significativas entre las condiciones de canastas e hipotermia con valores de (0.71 y 0.82, respectivamente), con valores intermedios para la captura con atarraya sin sedación (0.76) y con sedación por eugenol (0.78) (Fig. 14).

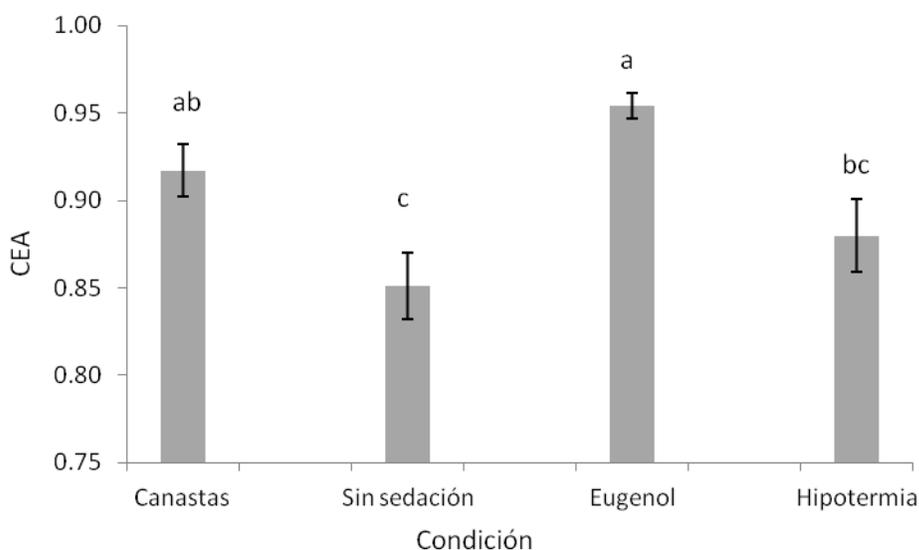


Figura 34.- Valores de CEA en músculo de *L. vanammei* sometidos a distintas condiciones de muestreo.

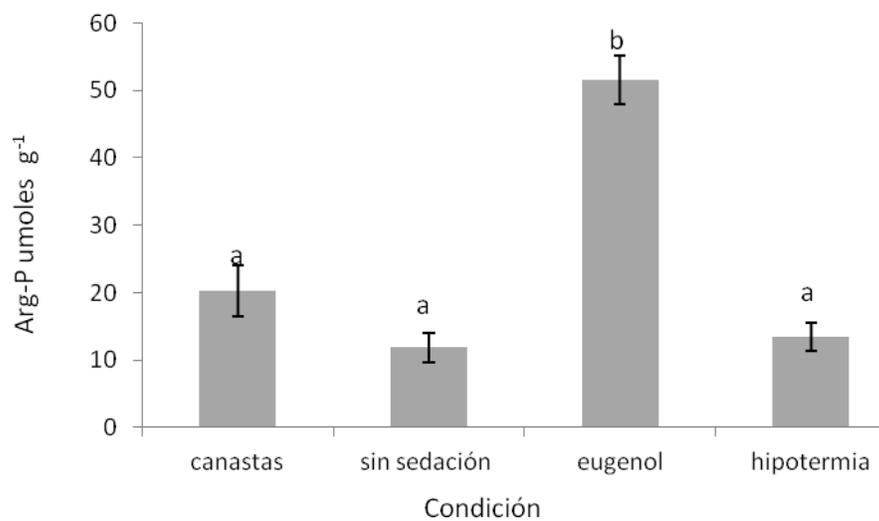


Figura 35.- Valores de Arg-P en músculo de *L. Vanammei* sometidos a distintas condiciones de muestreo.

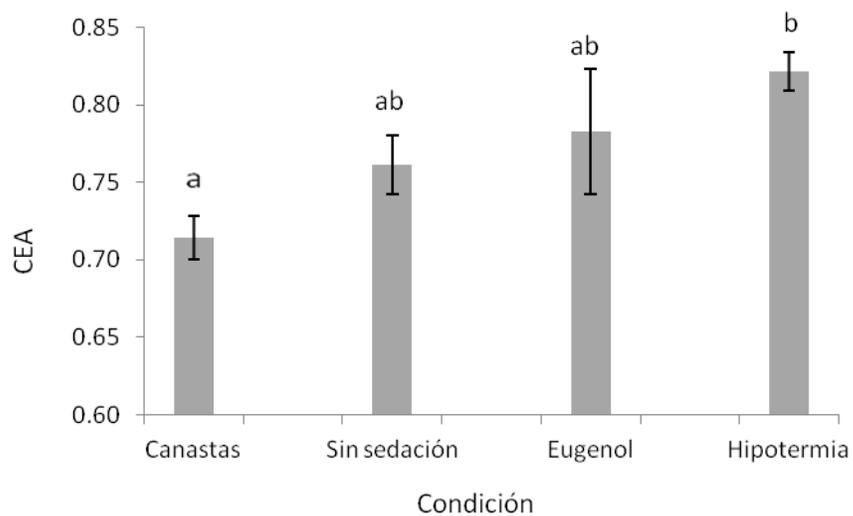


Figura 36.- Valores de CEA en hepatopáncreas de *L. vanammei* sometidos a distintas condiciones de muestreo.

### **8.7 Experimento V: atarraya sin sedación vs. atarraya con eugenol vs. atarraya con hipotermia vs. Canastas, del muestreo del 30-octubre-2010**

Para esta fecha, la población de camarones estaba muy disminuida y por lo tanto la captura de estos se dificultó, así que los organismos presentan un estrés adicional y diferente comparado con los muestreos anteriores. Los organismos han pasado 30 min dentro de una java sin aeración y expuestos al sol ya que fue necesario utilizar una panga para encontrar el total de organismos necesarios para las tres condiciones (eugenol, hipotermia y sin sedación).

Para los camarones de canastas, el proceso fue similar pero se realizó el día anterior lo que hasta cierto punto permitió su recuperación.

En este caso, los valores de todas las variables en hemolinfa fueron menores en los camarones en canastas comparado con los otros tres grupos. Cuantitativamente se obtuvieron valores más bajos en un 73 % para glucosa, 91.5 % para lactato, 55 % para triglicéridos, 26.5 % para hemocianina y 17 % para proteínas comparado con los camarones capturados con atarraya.

Para las distintas variables en músculo y hepatopáncreas se observa algo similar que en hemolinfa, con niveles significativamente menores de glucosa (70 %), triglicéridos (63 %) y proteínas (35 %) en hepatopáncreas, para la condición canastas (tabla XVII). De igual manera, en ambos órganos los niveles de lactato son menores en un 74 % para hepatopáncreas y 35 % para músculo). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para glucógeno en ninguno de los tejidos ni para la glucosa en músculo.

**Tabla XXXIV. Variables metabólicas determinadas en los distintos tejidos de *L. vanammei* (Media  $\pm$  E.S.) del muestreo 30-octubre-2010.**

<b>Hemolinfa</b>				
<b>Metabolito</b>	<b>Canastas</b>	<b>Sin sedación</b>	<b>Eugenol</b>	<b>Hipotermia</b>
<b>Proteínas totales mg mL<sup>-1</sup></b>	135.28 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>	162.18 $\pm$ 6.7 <sup>b</sup>	161.50 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	174.04 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>
<b>Lactato mg dL<sup>-1</sup></b>	2.45 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	29.06 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	36.95 $\pm$ 7.3 <sup>b</sup>	28.82 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>
<b>Glucosa mg dL<sup>-1</sup></b>	11.32 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	41.86 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>	48.33 $\pm$ 5.9 <sup>b</sup>	30.04 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>
<b>Triglicéridos mg dL<sup>-1</sup></b>	38 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	84 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	71 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	81 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
<b>Hemocianina mg mL<sup>-1</sup></b>	66.47 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	90.48 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	88.66 $\pm$ 3.7 <sup>4b</sup>	98.36 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>
<b>Hepatopáncreas</b>				
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	87.04 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>	136.52 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	122.08 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>	146.70 $\pm$ 11.9 <sup>b</sup>
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	0.52 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.97 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	1.56 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.80 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	6.45 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	21.42 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	17.99 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	21.76 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	8.54 $\pm$ 1.6	6.90 $\pm$ 0.7	6.17 $\pm$ 0.5	8.56 $\pm$ 0.4
<b>Triglicéridos mg g<sup>-1</sup></b>	14.49 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	39.66 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	33.83 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	43.26 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>
<b>Músculo</b>				
<b>Proteínas totales mg g<sup>-1</sup></b>	214.76 $\pm$ 15.1	234.28 $\pm$ 13.1	224.60 $\pm$ 13.5	234.41 $\pm$ 13.8
<b>Lactato mg g<sup>-1</sup></b>	1.76 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	2.71 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	3.01 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	2.83 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>
<b>Glucosa mg g<sup>-1</sup></b>	2.35 $\pm$ 0.6	3.61 $\pm$ 0.4	3.27 $\pm$ 0.25	3.31 $\pm$ 0.2
<b>Glucógeno mg g<sup>-1</sup></b>	0.95 $\pm$ 0.3	1.55 $\pm$ 0.2	1.52 $\pm$ 0.38	1.17 $\pm$ 0.17

En aquellos casos en los que se detectó un efecto significativo por la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) se realizó la comparación de medias por la prueba de Newman-Keuls a partir de la cual medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

**Tabla XXXV. Valores de oxígeno y temperatura en la condición tina y atarraya sin sedación a lo largo del muestreo.**

<b>19 octubre 2010</b>		
<b>Hora</b>	10:40 a.m.	11:14 a.m.
<b>O<sub>2</sub> mg Lt<sup>-1</sup></b>	2.6 (H)	5.4 (H)
	5.2 (A)	5.4 (A)
	5.6 (E)	4.5 (E)
<b>T°C</b>	19.6 (H)	19.8 (H)
	26.5 (A)	26.4 (A)
	26.1 (E)	26.1 (E)

(A) = Atarraya sin sedación, (H) = Hipotermia y (E) = Eugenol.

## **9. DISCUSIÓN**

### **9.1. Posibles efectos no controlados: ayuno y estadio de muda**

Se considera comúnmente que uno de los pre-requisitos para la evaluación de las variables en hemolinfa en animales experimentales es que estos permanezcan en ayuno por lo menos 12 horas antes de realizar las mediciones. Esto se ha establecido así con el fin de evitar la interferencia que el alimento recién consumido provoca en los niveles sanguíneos de éstos (Rosas et al., 2002). Esto se aplica comúnmente en trabajos a nivel laboratorio (Racotta y Palacios, 1998; Pascual et al., 2003a). Cuando este procedimiento es seguido con rigor es común observar valores poco dispersos, los cuales son un reflejo de la condición nutricional experimental (Rosas et al., 2002) u otra condición a la que han sido expuestos los organismos. En el caso de los animales de estanques externos, los valores de las variables metabólicas en hemolinfa tienden a ser mucho más dispersos, evidenciando la variabilidad asociada con la ingestión prácticamente constante de alimento por parte de la población de camarones cultivada en el estanque (Rosas et al., 2002). En este sentido y si bien se considera que en general los camarones peneidos tienen una actividad de ingestión continua (Cuzon et al., al 2004), esto es más bien válido para el alimento en condiciones naturales, y no necesariamente para el alimento peletizado. En este trabajo, las condiciones de laboratorio se simulaban con base al procedimiento usado para los estanques en donde se suprimió la ración de alimento de las 17:00 horas del día anterior al muestreo, independientemente de que los organismos permanecieran en el estanque donde tenían acceso al alimento natural o bien hayan sido aislados en canastas o tinas en las cuales no había ni el alimento natural del fondo del estanque ni el alimento peletizado, y únicamente podemos considerar la microbiota del agua. A diferencia del experimento de laboratorio, no se tiene certeza de que los camarones del estanque no hayan ingerido alimento natural del estanque en un tiempo indeterminado previo al muestreo, por lo cual la validación en laboratorio tiene sus limitaciones y es posible, tal como se comentará más adelante que las diferencias por efecto de aislamiento en tinas o canastas se deban parcialmente al efecto ayuno. En cualquier caso, el objetivo del experimento en laboratorio era analizar que tan importante podía ser desde el punto de vista cuantitativo, el efecto del ayuno lo cual se

analizará a continuación en conjunto con los antecedentes de otros trabajos con respecto a la influencia del ayuno, dependiendo de las condiciones de éste.

No se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las variables en los tres tejidos analizados en el experimento a nivel laboratorio, que comparó organismos alimentados vs. ayunados. Es importante recordar el protocolo experimental para entender las diferencias reales entre ambos grupos. Normalmente se suministraba alimento peletizado dos veces al día, en la mañana a las 9:00 horas y en la tarde a las 17:00 horas. El día anterior al experimento, se suprimió el suministro de la tarde y los organismos fueron muestreados al día siguiente a partir de las 9:00 horas, por lo cual se considera que a los organismos en “ayuno” se les había ofrecido comida 24 horas antes, aunque se quedaron sin comida por un período de 16 horas (desde la 17:00 horas del día anterior). Por el contrario, a los organismos “alimentados” se les ofreció comida 16 horas antes y nunca se quedaron sin comida, pero es muy probable que hayan comido sólo en las primeras horas. En este sentido, la situación de ayuno de 16 y 0 horas en los grupos ayuno vs. alimentados es probable que corresponda más bien a una situación de ayuno de 22 y 14 horas, respectivamente si asumimos que el alimento fue consumido principalmente en las primeras 2 horas después de haber ofrecido el alimento (Bonilla, 2009).

Aunque en general se acepta que las proteínas son la fuente principal de energía en crustáceos (New, 1976; Cuzon et al., 1980; Barclay et al., 1983), el orden de los sustratos energéticos utilizados por los crustáceos durante periodos de privación de alimento varía considerablemente (Clifford y Brick, 1983; Sánchez-Paz et al., 2006). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos la duración del ayuno a lo largo de la cual se evalúa el uso de reservas energéticas en crustáceos es del orden de varios días (para revisión ver Sánchez-Paz et al., 2006). Así, la falta de diferencias significativas para los niveles de proteína, lípidos y carbohidratos en los tres tejidos en este trabajo se deben muy probablemente a que no hay una utilización de reservas lo suficientemente marcada desde el punto de vista cuantitativo en tan poco tiempo como para que se pueda apreciar en los niveles de reservas, combustibles y metabolitos analizados, indicando que los camarones están bien adaptados para tolerar la privación de alimentos por un tiempo corto. A su vez, esta tolerancia está estrechamente relacionada con su estado nutricional previo, ya que los niveles de proteína

en la dieta afectan la concentración de proteína en la hemolinfa de camarón durante el período de ayuno (Pascual et al., 2006).

A pesar de la importancia de las proteínas para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, en condiciones de ayuno corto de 120 horas las principales fuentes de energía utilizadas a corto plazo, son la glucosa, seguida por acilglicéridos, mientras que la utilización de proteínas no es substancial (Sánchez-Paz et al., 2007), como una estrategia adaptativa para evitar el uso de macromoléculas de alta importancia para fines funcionales y estructurales. Así al igual que nuestro trabajo, se ha reportado cierta constancia de proteínas en hemolinfa y hepatopáncreas en camarones alimentados y privados de alimento aún en períodos más prolongados (Sánchez-Paz et al., 2007). De hecho, la disminución de proteínas en hemolinfa por efecto de ayuno en *L. vannamei* es mínima al cabo de 7 días y depende del contenido de proteína en la dieta previo al ayuno, y se aprecia de manera muy marcada al cabo de 14 días (Pascual et al., 2006).

En contraste, la glucosa en hemolinfa y hepatopáncreas así como el glucógeno del hepatopáncreas si disminuyeron al cabo de 18 a 24 horas de ayuno y hasta el final del periodo analizado de 120 horas (Sánchez-Paz et al., 2007). En cambio, Pascual et al. (2006) no observaron ningún cambio en el glucógeno del hepatopáncreas al cabo de 7 y 14 días de ayuno, y la disminución de la glucosa en hemolinfa al cabo de 7 días de ayuno solo se observó en camarones cuya dieta era un bajo contenido de proteínas (5 %). En nuestro trabajo no se observó ningún efecto probablemente por el corto periodo de tiempo, aunque posiblemente también influyó el alto nivel de proteína (35 %) en la dieta. Es importante señalar que es necesario mejorar los protocolos de este tipo de experimentos dado que ni en nuestro trabajo ni en el de Sánchez-Paz et al. (2007), en los cuales las evaluaciones se hacen en un periodo relativamente corto de tiempo, se tuvo la precaución de monitorear cuando y cuanto comieron realmente los organismos control (alimentados).

Aunque los lípidos no son la principal fuente de energía en crustáceos, estos pueden movilizarse en condiciones de ayuno. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas, esto nuevamente porque el tiempo de ayuno fue insuficiente. Sánchez-Paz et al. (2007) reportan una disminución notable de acilglicéridos en hemolinfa así como de lípidos totales y acilglicéridos del hepatopáncreas hasta después de 48 horas de ayuno, justo

después de que los niveles de glucosa bajaron a su mínimo. La importancia de la reserva de lípidos para sostener la demanda metabólica del organismo ha sido claramente puesto de manifiesto más a largo plazo por la disminución en un 90 % del peso del hepatopáncreas al cabo de 21 días de ayuno y del nivel de lípidos en aproximadamente un 70 % desde el séptimo día de ayuno (Pascual et al., 2006). En postlarvas de *L. vannamei*, cuyo metabolismo es más acelerado, la disminución de triglicéridos en todo el cefalotórax es total, al cabo de un día de ayuno mientras que para las proteínas, la disminución se puede apreciar sólo a partir del cuarto día, alcanzando niveles tan solo 50% menores al cabo de 12 días (Stuck et al., 1996).

## **9.2. Estatus metabólico del camarón *Litopenaeus vannamei* durante los diferentes muestreos en estanques y sus diferentes etapas del ciclo de muda**

Por otro lado, las pequeñas diferencias obtenidas para algunas variables entre el estadio de intermuda y el de premuda temprana no fueron consistentes de un muestreo a otro y dada la proporción relativamente constante de organismos en intermuda y premuda temprana de un muestreo a otro, se asumió que la posible fuente de error por el estadio de muda era mínimo. De hecho en los estudios existentes existe controversia y resultados diferenciales en cuanto a las variaciones que hay para distintas variables en hemolinfa en relación al estadio de muda. En este sentido, Chan et al. (1988) obtuvieron un incremento de proteínas en los estadios de premuda en comparación con la intermuda. De manera similar, Galindo et al. (2009) y Bonilla (2009) observaron un incremento (no significativo en el caso de Bonilla, 2009) en la hemocianina en estadio de premuda, efecto que también fue observado en el presente trabajo el día 2 de Octubre. Sin embargo, en otros trabajos, no se obtiene diferencias para los niveles de proteínas y hemocianina entre intermuda y premuda (Mugnier y Justou, 2004), y solo se reportan niveles menores para la postmuda (Cheng et al., 2002).

En lo que respecta a carbohidratos, el incremento de glucosa registrado el 2 de octubre para la premuda concuerda con lo obtenido por Galindo et al. (2009) y Bonilla (2009), aunque el incremento en premuda no fue significativo en ambos estudios, pero difiere de

los resultados de Chan et al. (1988) con una disminución de glucosa para la premuda. Por otro lado, Mugnier y Justou (2004) no observan ninguna variación de la glucosa a lo largo del ciclo de muda y sólo observa una disminución no significativa de los niveles de lactato en premuda tardía.

En cuanto a los niveles de lípidos, el incremento observado en de triglicéridos en la premuda el día 30 de Octubre concuerda con trabajos previos de acuerdo con el importante papel de los lípidos como la reserva principal para sostener el metabolismo en condiciones de ayuno y por el hecho de que al acercarse la muda, los camarones entran en un estado de ayuno (Chan et al., 1988; Bonilla, 2009). Al analizar clases de lípidos y su contenido particular de ácidos grasos en todo el camarón en *Penaeus japonicus*, no se observó una variación considerable en los lípidos estructurales como fosfolípidos y esteroides, reportándose una acumulación considerable de triglicéridos en la premuda intermedia seguido de una fuerte disminución en la premuda tardía (Teshima et al., 1977). Un patrón similar se obtiene para los lípidos totales en el hepatopáncreas de *Penaeus schmitti* con los niveles más altos en premuda temprana e intermedia con respecto a la postmuda, la intermuda y la predmuda tardía (Fernández et al., 1995). Sin embargo en *Penaeus durorarum*, el incremento de triglicéridos es continuo a lo largo de toda la premuda aunque el patrón es ligeramente diferente dependiendo si se trata de organismos silvestres y domesticados (Bonilla, 2009). En un trabajo previo en el laboratorio, Carreño-Mejía (2009) no observó diferencias en *L. vannamei* para los niveles de lípidos totales o acilglicéridos en hepatopáncreas ni para triglicéridos en hemolinfa entre postmuda, intermuda y premuda, aunque no se realizó la comparación entre los diferentes sub-estadios de la premuda.

### **9.3. Variación de los valores basales en animales de la condición atarraya sin sedación igual a respuesta de estrés**

El objetivo del trabajo es el de atenuar la respuesta de estrés por la captura de los camarones del estanque con atarraya, con la cual asumimos de antemano que al menos algunas de las variables medidas si se alteran sustancialmente como parte de esta respuesta. Lo anterior nos lleva por un lado a la necesidad de buscar procedimientos que permitan

obtener muestras de camarones de estanques evitando que se desencadene la respuesta (es decir el objetivo principal del trabajo). Por otro lado, es altamente deseable proponer con base a una serie de criterios, cuales son los valores cuantitativos de estas variables que puedan considerarse como valores "basales" o de referencia tanto en condiciones de estanques como de laboratorio, lo cual podría considerarse como objetivo secundario y emergente de este trabajo, al analizar los tratamientos que atenuaron con mayor eficiencia el estrés del muestreo y comparar en qué medida se obtienen valores similares a las condiciones de laboratorio. Para iniciar este análisis es importante, en primera instancia, hacer una revisión de la información publicada o comunicada personalmente en relación a las variables en hemolinfa que han sido más estudiadas. En la tabla XIX, se muestra los valores de glucosa y lactato en distintas situaciones de estrés, tanto en condiciones de laboratorio como de estanques, así como en una situación intermedia de tanques al exterior. Estas dos variables que son las que más claramente se modifican como parte de la respuesta de estrés, tal como se puede apreciar en la tabla XIX.

**Tabla XXXVI. Valores de glucosa y lactato en hemolinfa de camarones peneidos sometidos a diferentes condiciones de estrés a corto (minutos a horas) y largo plazo (horas a días).**

Tipo estrés	Glucosa (mg dL <sup>-1</sup> )		Lactato (mg dL <sup>-1</sup> )		Ref.
	Basal	Estrés	Basal	Estrés	
Toma repetida de muestras (2 hrs)	15	55 *	10	30	1
Inyección de serotonina (2 hrs)	15	55 *	10	55 *	1
Alta densidad (4 semanas)	18	20			2
Exposición al aire 10 min (muestra a 45 min)	18	37.8 *			2
Exposición a hipoxia (2 mg L <sup>-1</sup> – 4.5 hrs)	18	50.4 *			2
Exposición a CO <sub>2</sub>	20	46.8 *			2
Exposición a baño de formalina	15.7	37.1 *			3
Niveles postcaptura de estanque		63			3
Exposición a amonio (30 mg L <sup>-1</sup> total N; 24 hrs)	15.5	22.7 *	6.9	5.3	4
Persecución	14.6	47.3 *	2.7	9.3 *	5
Aclimatación a laboratorio (8 días) a 27 °C	14	13	7	3 *	6
Aclimatación a laboratorio (8 días) a 31 °C	12	8 *	8	7	6
Exposición a hipoxia (3 días)	12.9	57 *	8	30.1 *	7
Exposición a hipoxia (21 días)	12.9	45.3 *	8	34.4 *	7
Hipertermia a 33 °C por 5 días	21	7.5 *	9	4	8
Tanques interior		31		15	9
Tanques exterior		42		14	9
Exposición a amonio (2 mg L <sup>-1</sup> NH <sub>3</sub> ; 24 hrs)	35	48 *	27	18 *	10
Manipulación diaria en tanques al interior de laboratorio (28 días)	8.5	12.1 *	3.9	4.2	11
Idem en tanques al exterior (28 días)	16.9	17.1	4.2	3.6	11
Confinamiento en jaula estanque (48 hrs)	55.8	39.3			12
Hiposalinidad de 15 a 0 ups (7 h)	32.2	22.7 *			13
Hipersalinidad de 15 a 35 ups (7 h)	32.2	38.5 *			13
Exposición a WSSV (2 días)	32.2	39.7 *			13

<b>Exposición a patógenos (Vibrio, 36 hrs)</b>	12	27 *	5.5	14.2 *	14
<b>Exposición a amonio (2 mg L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>; 24 hrs) y/o hipoxia (1.5 mg L<sup>-1</sup>; 24 horas) estadios C y D<sub>2</sub></b>	50	68 *	32	67 *	15
<b>Ablación unilateral o bilateral en ♀ y ♂ (5días)</b>	6	8 *	4.8	6.5	16
<b>Transferencia y exp. al aire (1 y 24 horas)</b>	16.5	60.1 *	6.2	8.5 *	17
<b>Transferencia y persecución (10 a 240 min)</b>	16	42 *	2.5	17 *	18
<b>Alta densidad de cultivo (30 días)</b>	13.9	19.1	31.3	22.7 *	19
<b>Captura con atarraya en estanque de marea</b>		58		260	20
<b>Captura con atarraya en estanque de marea</b>	18	70	10	60	21
<b>Captura con atarraya en estanque supralitoral</b>	30	80	15	160	22
<b>Expo. Hipoxia 0.5 mg L<sup>-1</sup></b>	10	40	5	110	23
<b>Expo. Hipoxia 0.5 mg L<sup>-1</sup></b>	5	75*	11	57*	24

\* Indica un efecto significativo

1 Racotta y Palacios, 1998. *L. vannamei*.

2 Hall & Van Ham, 1998.

3 Van Ham & Hall, 1998.

4 Racotta y Hernández-Herrera, 2000.

5 Carreño, 2000.

6 Sánchez et al., 2001. *L. setiferus*

7 Racotta et al., 2002.

8 Pascual et al. 2003a. *L. setiferus*

9 Pascual et al., 2003b ; *L. vannamei*

10 Mugnier y Justou 2004 ; *L. stylirostris*

11 Mercier et al. , 2006

12 Mugnier et al., 2006 ; *L. stylirostris*

13 Joseph y Philip, 2007 ; *P. monodon*

14 Hsieh et al., 2008. *L. vannamei*

15 Mugnier et al., 2008; *L. stylirostris* (glucosa: amonio/D<sub>2</sub>; lactato : amonio+hipoxia/D<sub>2</sub>)

16 Sainz-Hernandez et al., 2008; *L. vannamei*. (glucosa: ♂ unilateral; lactato: ambos sexos unilateral)

17 Mercier et al., 2009. *L. vannamei* ; se indican valores al cabo de una hora del estímulo

18 Aparicio-Simón et al., 2010. *L. vannamei*; se indican los valores máximos obtenidos para la respuesta de estrés (60 min para glucosa, 30 min para lactato)

19 Aguilar et al. (En prensa), *L. vannamei*

20 Racotta y Arcos (resultados no publicados, ciclo 2005) *L. vannamei* organismos de 6 meses de edad capturados en septiembre que permanecieron acinados en una java sin aeración

21 Racotta y Villarreal (resultados no publicados, ciclo 2006) *L. vannamei* organismos de 5 meses de edad capturados en Octubre bajo condiciones de cultivo intensivo con aeración: como valores control se consideran organismos recién capturados y como estresados los que permanecieron hacinados en una java sin aeración durante 30 min.

22 Aparicio Simón 2009 *L. vannamei* en condiciones similares a la anterior y con la misma consideración para organismos y estresados a excepción de que estos últimos permanecieron 1 hora hacinados sin aeración.

23 Llundmila M. 2006. *Farfantepenaeus californiensis*; exposición a hipoxia 0.5 mg L<sup>-1</sup>

24 Magallón P. S. 2004. *L. vannamei*; exposición a hipoxia 0.5 mg L<sup>-1</sup>

Si hacemos un análisis minucioso de los diferentes grupos de trabajo y de los valores comúnmente encontrados en los grupos considerado como control, podemos apreciar tres grupos de trabajo con 3 o más artículos publicados en el tema y básicamente dos grandes grupos de valores cuantitativos. Así el grupo del CIBNOR (Racotta y colaboradores, obtienen por lo general valores de glucosa por lo general menores a 20 mg  $\text{dL}^{-1}$  (ref. 1, 4, 5, 7, 11, 16 y 19) en condiciones de laboratorio, mientras que en estanques (ref. 20 a 22) y aunque es difícil considerar un grupo control, se reportan valores de 18 a 30 mg  $\text{dL}^{-1}$ . El grupo del IFREMER (Mugnier y colaboradores, ref. reportan valores superiores a los 35 mg  $\text{dL}^{-1}$  tanto en condiciones de laboratorio (ref. 10 y 15) como de estanques (ref. 12). En condiciones de laboratorio, el grupo de la UNAM (Rosas y colaboradores) reportan niveles menores a 20 mg  $\text{mL}^{-1}$  (ref. 6 y 8; Rosas et al., 2004) aunque en algunos caso los niveles llegan a ser mayores a 30 (ref. 9), superando incluso los 40 mg  $\text{dL}^{-1}$  en condiciones de estanques (ref. 9). Los demás trabajos caen de manera general en estas dos grandes categorías con valores menores a 20 (ref. 2, 3, 14) o superiores a os 30 mg  $\text{dL}^{-1}$  (ref. 13). De las situaciones de estrés más comúnmente analizadas, las más comunes a corto plazo (minutos a horas) son diversos tipos de manipulación (ref. 1, 5, 17 y 18) y exposición a hipoxia o aire (ref. 2, 15 y 17) resultando en todos los casos en una notables hiperglucemia, alcanzando niveles cercanos o superiores a los 50 mg  $\text{dL}^{-1}$ . Mas a largo plazo (días) otros tratamientos con un efecto hiperglucemiante son la exposición a altos niveles de amonio (ref. 4, 10, 15), hipoxia (ref. 7) o a agentes patógenos (ref. 13 y 14), aunque en este caso los valores alcanzados son muy variables y van desde 23 mg  $\text{dL}^{-1}$  (ref. 4) hasta cercano a los 70 mg  $\text{dL}^{-1}$  (ref. 15). En otras situaciones de estrés a largo plazo como aclimatación a condiciones de laboratorio acompañadas o no de hipertermia (ref. 7 y 8), manipulación diaria (ref. 11 y 17), alta densidad (ref. 2 y 19) o confinamiento (ref. 12), no se observa un incremento de glucosa. Por el contrario, en algunas situaciones como hipertermia (ref. 7 y 8) se observa incluso una disminución lo cual concuerda con lo observado mas a corto plazo por la misma hipertermia (Carreño-Mejía, 2009) o la disminución de salinidad (ref. 13). Finalmente la condición de estrés que más nos interesa es la de los estanques mismos en la cual nuestro argumento es que la captura misma representa un respuesta de estrés en la cual se obtienen valores entre 60 y 80 mg  $\text{dL}^{-1}$  (ref. 20 a 22) y que fue observada también por otros trabajos donde se reportan valores de 63 mg

$\text{dL}^{-1}$  (ref. 3). De hecho, en otros trabajos en tanques grandes de  $20 \text{ m}^2$  al exterior (ref. 9) o en un estanque de  $7.5 \text{ ha}$  (ref.12) se obtienen valores altos de  $42$  y  $56 \text{ mg dL}^{-1}$  respectivamente muy probablemente por el estrés inducido por captura. Sin embargo los mayores niveles de glucosa en condiciones de tanques al exterior también se han atribuido a la disponibilidad de alimento natural (ref. 9), con la cual se ha explicado la diferencia entre tanques al interior y exterior (ref. 11). La calidad misma del alimento peletizado podría ser otro factor y de hecho, Rosas et al. (2002) concluye que los altos niveles de glucosa obtenidos en una granja camaronera de Sinaloa muy probablemente se debe a la baja calidad de alimento que fue compensado por los camarones ingiriendo grandes cantidades de materia orgánica de origen bacteriano, lo cual representó la principal causa de niveles más elevados de glucosa. Lo anterior está basado en que los niveles de glucosa también pueden reflejar el contenido de carbohidratos de la dieta (Rosas et al., 2000) Esto es poco probable por lo que se analizará más adelante en el presente trabajo y es más factible que los niveles altos hayan sido consecuencia del estrés por captura. De cualquier manera, lo anterior ilustra nuevamente la necesidad de establecer valores basales bajo ciertas condiciones y con criterios muy bien definidos para que este tipo de variables realmente puedan ser una herramienta útil y confiable de diagnóstico.

Como ya se ha mencionado el lactato es el principal producto final del metabolismo anaeróbico de los crustáceos (Spicer et al., 1990) y su incremento puede estar relacionado con diversos agentes estresantes que se presentan en la tabla XIX. Al igual que para la glucosa es útil hacer un primer análisis de los niveles basales. Prácticamente podemos hacer nuevamente dos grandes grupos: uno con valores de laboratorio menores a  $10 \text{ mg dL}^{-1}$  donde caen, con algunas excepciones, los trabajos del CIBNOR (ref. 1,4, 7, 11, 16-18), de la UNAM (ref. 6 y 8) y otros grupos (ref. 14) y por otro lado otro grupo con valores alrededor de los  $30 \text{ mg dL}^{-1}$  con los trabajos del IFREMER (ref. 10 y 15). La únicas excepciones son valores de  $15 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 9) y de  $31 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 19) en donde los autores reconocen que se trata de valores altos que pudieron haberse debido al estrés de muestreo. Al respecto, la influencia de diversos estresores es muy variada desde el punto de vista cuantitativo pudiéndose alcanzar un nivel típico de respuesta de estrés tan bajo como de  $9 \text{ mg dL}^{-1}$ , pero significativamente diferente del control (ref. 5 y 17), o bien entre  $30$  y  $55 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 1 y 7) o de  $67 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 15) si consideramos los trabajos del grupo con

altos valores basales. Además de la naturaleza del estímulo estresor, un aspecto crucial a considerar es el curso temporal de la respuesta dado que se puede observar mucho más rápido que el incremento de glucosa pero se mantienen por menor tiempo que el de la glucosa. Ante un estímulo puntual de transferencia y persecución por un minuto, el incremento del lactato se aprecia desde los 10 minutos, alcanza su valor máximo a los 30 minutos después de lo cual empieza a decaer, restableciéndose los valores del grupo control al cabo de 240 minutos (Aparicio-Simón et al., 2010). En cambio, para la glucosa, el incremento se aprecia hasta después de 60 minutos y no hay una recuperación completa al cabo de 240 minutos (Aparicio-Simón et al., 2010). Al igual que para la glucosa, los valores más altos se obtienen cuando la propia captura con atarraya es el estímulo estresor solo que en este caso, la respuesta en magnitud si fue mucho mayor alcanzando un valor “record” de  $260 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 20) aunque en otras condiciones la repuesta es mucho menor, e.g.  $60 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 21),  $160 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 22),  $44 \text{ mg dL}^{-1}$  (este trabajo). De hecho en los mismos camarones y bajo las mismas condiciones de cultivo para las cuales se reportan los valores de  $260 \text{ mg dL}^{-1}$  en septiembre, en los meses de enero y mayo los niveles son de 50 y  $150 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectivamente, indicando una probable influencia de la temperatura (Arcos et al., 2009). Adicionalmente, en camarones de la misma cohorte pero crecidos en raceways los valores en septiembre, enero y mayo son de 100, 20 y  $10 \text{ mg dL}^{-1}$ , sugiriendo que con el manejo continuo en raceway, los organismos son menos susceptibles al estrés por captura (Arcos et al., 2009). Además de la posible influencia de la temperatura y del manejo rutinario durante el cultivo, otra variable que puede influenciar el nivel de lactato postcaptura es el oxígeno disuelto. Excepto en el presente trabajo donde se obtuvieron los valores más bajos para estanques y en donde se tuvo aeración en la java mientras los organismos eran muestreados, en los demás casos no se tuvo esa precaución y en un caso si se registró que el oxígeno podía bajar hasta  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  (Racotta y Villarreal, resultados no publicados).

Por todo lo anteriormente expuesto, los valores de glucosa y lactato obtenidos el 2 de octubre para la condición atarraya ( $48$  y  $44 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectivamente) son característicos de una respuesta de estrés por captura con atarraya y la permanencia en una java hasta ser muestreados. En contraste para la fecha 9 de octubre se tienen valores de glucosa en hemolinfa mucho menores ( $13 \text{ mg dL}^{-1}$ ) y que de hecho son similares a los valores basales

de las condiciones de laboratorio arriba mencionadas. Hay que recordar que el día cinco de octubre hubo un evento de hipoxia ambiental en el estanque de cultivo lo que acarrió una gran mortandad de la población y una pérdida considerable de la productividad natural en el estanque. La hiperglucemia con producción de lactato es una típica respuesta observada bajo hipoxia aguda (Soñanez-Organis, 2010) o crónica (Racotta et al., 2002) que muy probablemente ocurrió como respuesta de manera muy acentuada el día 5 de Octubre en conjunto con otras respuestas metabólicas de hipoxia como la disminución de la carga energética y de la reserva de fosfágenos (Englnad y Baldwin, 1983, Abe et al., 2007). En este sentido, la primera explicación sería que para el 9 de Octubre los niveles bajos tanto de glucosa como de lactato puedan ser interpretados como una incapacidad de poder responder al estímulo estresor por un “debilitamiento” general del organismo (estado fisiológico o condición nutricional), el cual concuerda con valores más bajos de otras variables que se discutirá más adelante. En este sentido es un concepto clásico que una de las consecuencias adversas del estrés es la incapacidad de responder a otro estímulo estresor poniendo en riesgo la supervivencia misma. De manera más puntual y adecuada a una fuerte condición de hipoxia como la registrada en esas fechas, Storey y Storey (1990) plantean, la producción de ATP puede ser sustituida por una depresión metabólica fuerte, cuando el oxígeno del medio ambiente cae por debajo de un nivel crítico. Esto racionará el uso de carbohidratos y maximiza el tiempo de supervivencia.

Para la fecha 13 de octubre se presenta un ligero incremento de lactato y glucosa en hemolinfa en la condición atarraya sin sedación esto posiblemente por una ligera recuperación tanto de los organismos como del estanque. Para las fechas 19 y 30 de octubre se sigue la tendencia en aumento de los valores de glucosa y lactato en hemolinfa. El procedimiento empleado el 30 de octubre implica una condición estresante mayor que la de otros días, en particular con respecto al 19 de Octubre donde se consideraron los mismos grupos experimentales, dado que implicó mayor esfuerzo de captura y por ello la suma de estímulos estresores de mayor intensidad dado que los camarones permanecieron mayor cantidad de tiempo en la java sujetos a un estrés de hipoxia y confinamiento. Ello podría explicar mayores niveles de glucosa el día 30 de octubre con respecto al 19, de hecho deberían ser mayores incluso que el día 2 de octubre. Sin embargo, también es posible que temperaturas menores y niveles de oxígeno mayores iniciales registrados el 30 de octubre

con respecto al día 2 contrarresten una mayor intensidad de la respuesta de estrés. Tal como ya se mencionó, esta posibilidad se consideró para el lactato en el trabajo de Arcos et al. (2009) lo cual explicaría el porqué los niveles de lactato son inclusive menores el 30 de octubre que el 2 de octubre a pesar de que hubo una suma de estímulos estresores inclusive mayor. Adicionalmente, el tiempo transcurrido desde la aplicación del mayor estresor (la captura misma) puede explicar las diferencias dado que después de 30 minutos de la aplicación de un estímulo estresor puntual, el lactato tiende a retornar hacia valores basales (Aparicio-Simon et al., 2010).

En cuanto a las otras variables metabólicas en hemolinfa medidas en este trabajo proteínas, hemocianina y triglicéridos, su asociación con condiciones de estrés ha sido menos clara que para glucosa y lactato. Por lo contrario, su significado ha sido más relacionado con el estado nutricional (Rosas et al., 2002, Pascual et al., 2003) y con la capacidad de respuesta inmune (Perazzolo, et al., 2002, Mercier et al., 2006). En cualquier caso, considerando que la captura misma de organismos de estanques es un excelente modelo de respuesta de estrés, el presente trabajo pretende contribuir al significado de estas variables como elementos de dicha respuesta. Por lo anterior, al igual que para la glucosa y el lactato es importante revisar algunos antecedentes al respecto.

**Tabla XXXVII. Valores de proteínas, hemocianina y acilglicéridos en hemolinfa de camarones peneidos sometidos a diferentes condiciones de estrés.**

Tipo estrés	Proteínas (mg mL <sup>-1</sup> )		Hc (mg mL <sup>-1</sup> )†		Acilglicéridos (mg dL <sup>-1</sup> )		Ref.
	Basal	Estrés	Basal	Estrés	Basal	Estrés	
<b>Toma repetida</b>	130	105			40	18 *	1
<b>Amonio</b>	174.7	168.8	82.3	68.3 *	31	21 *	4
<b>Persecución</b>	105.4	104.0			43.9	37.8 *	5
<b>Aclimatación (27°C)</b>	707	345 *			38	27 *	6
<b>Aclimatación (31°C)</b>	254	220			49	26 *	6
<b>Hipoxia 3d</b>	114.9	117	84.6	76.1			7
<b>Hipoxia 21d</b>	114.9	135.7	84.6	110.6 *			7
<b>Hipertermia 5d</b>	225	100*			40	15 *	8
<b>Tanques interior</b>		102.8		92.7		145	9
<b>Tanques exterior</b>		217.5		117.7		112	9
<b>Amonio</b>	170	169	122	115,9			10
<b>Manip. Tq. al interior</b>	90.8	95.5	54.6	62	35.2	34.4	11
<b>Idem al exterior</b>	122	111*	83	72.7	49.7	39.5*	11
<b>Confinamiento</b>	160.8	135.1*	133.6	103.7*			12
<b>Hiposalinidad</b>	89.4	87					13
<b>Hipersalinidad</b>	89.4	110.5*					13
<b>Exposición a WSSV</b>	89.4	121.5*					13
<b>Patógenos (Vibrio)</b>					17.5	42 *	14
<b>Amonio y/o Hipoxia</b>	155	123 *	170	158			15
<b>Ablación</b>	118	70 *			41	18 *	16
<b>Transferencia</b>			97	77 *	61	59	17
<b>Transferencia</b>	88.1	77.7 *	65.6	62.8	59	48.3	18

Ver Tabla XIX. Para condiciones más específicas y referencia.

Respecto a los valores basales de proteínas, estos se encuentran de manera muy general entre 100 y 200 mg mL<sup>-1</sup> salvo algunos en los cuales están ligeramente por debajo

de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  (ref. 11, 13 y 18) o ligeramente por arriba de 200 (ref. 6 y 8), siendo relativamente claro que el valor reportado de  $707 \text{ mg mL}^{-1}$  (ref. 6) es muy probablemente un error de cálculo. La hemocianina es la principal proteína circulante de los crustáceos aunque ello no necesariamente se aprecie en la tabla XX por los métodos particulares de medición en cada caso. La posible utilización de la proteína en hemolinfa como combustible circulante bajo condiciones de estrés fue propuesta por Racotta y Palacios (1998), aunque no se ha visto una disminución significativa en estrés por manipulación (ref. 1). Sin embargo, desde entonces varios trabajos indican esta disminución en varias condiciones de estrés agudo (ref. 18), pero principalmente crónico a partir de un día o más (ref. 7, 11, 12 y 16). En algunos casos se observa un incremento de proteínas pero tiene que ver con una respuesta fisiológica específica como el papel de aminoácidos libres en la adaptación a altas salinidades (ref. 13) así como el papel de varias proteínas circulantes como un efector de la respuesta inmune de crustáceos. Si bien la hemocianina, debería seguir un patrón similar al de las proteínas y si bien su disminución también se ha asociado con algunas situaciones de estrés (ref. 4, 12 y 17), solo coincide la disminución de proteínas en un solo estudio (ref. 12), aunque en uno de los trabajos no se reportaron los niveles de proteína por un problema técnico (ref. 17). Nuevamente hay un trabajo en el cual se observa más bien un incremento en la hemocianina (ref. 7), lo cual tiene que ver un incremento de la concentración de hemocianina para poder aumentar la capacidad acarreadora de  $\text{O}_2$  en la sangre lo cual representa un mecanismo adaptativo bien conocido no solo en crustáceos (Racotta et al., 2002) sino en todos los animales que poseen pigmentos respiratorios para incrementar la capacidad acarreadora de oxígeno en la sangre (Schmidt-Nielsen, 1997).

Los acilglicéridos en su gran mayoría son triglicéridos y que pueden constituir una reserva circulante relativamente importante para crustáceos que carecen de un tejido adiposo bien definido y sus niveles en condiciones de laboratorio están entre 30 y  $40 \text{ mg dL}^{-1}$  salvo algunas excepciones o algunos casos particulares que se pueden explicar. Las excepciones que no podemos explicar porque son de otros grupos de trabajo son valores superiores a los  $100 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 9) y en particular en la condición de tanques al interior de laboratorio, principalmente porque el mismo grupo de trabajo obtiene valores mucho menores en otros trabajos (ref. 4 y 6, Rosas et al., 2004). La otra excepción son valores

menores a  $20 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 14) que sin embargo se incrementan a  $42 \text{ mg dL}^{-1}$  por la exposición a patógenos. Los valores para los cuales si podemos proponer una explicación son los obtenidos en tanques de concreto al exterior en el CIBNOR con valores entre 50 y  $60 \text{ mg dL}^{-1}$  (ref. 11, 17 y 18) e incluso cercanos a los  $80 \text{ mg dL}^{-1}$  (Aguilar et al., 2012). En los estanques de mareas del CIBNOR también se han reportado niveles de  $70 \text{ mg dL}^{-1}$  que fueron significativamente más altos que camarones de la misma cohorte crecidos en agua clara en raceways con valores alrededor de los  $40 \text{ mg dL}^{-1}$  (Arcos et al., 2009).

#### **9.4. Atenuación de la respuesta metabólica de estrés: variables bioquímicas en hemolinfa y tejidos (músculo y hepatopáncreas)**

En las figuras 15, 16, 17, 18 y 19 se resumen los resultados obtenidos para las variables glucosa, lactato, proteínas, triglicéridos y hemocianina en hemolinfa para las distintas fechas y tratamientos evaluados en cada fecha. Para glucosa y lactato, se indican los intervalos de valores considerados como basales o de respuesta de estrés obtenido en distintos trabajos previos (ver Tablas XIX y XX). Lo anterior facilitará el análisis y discusión de los resultados en términos de los tratamientos que permitieron atenuar la respuesta de estrés es necesario recordar que hubo un efecto importante el día de muestreo que ya se analizó para el tratamiento de captura con atarraya. Sin embargo, la fecha de muestreo también afectó los demás tratamientos tal como se analizará puntualmente a continuación. Por lo anterior, y tal como ya se mencionó, la fecha idónea para poder hacer las comparaciones más certeras es el 19 de Octubre.

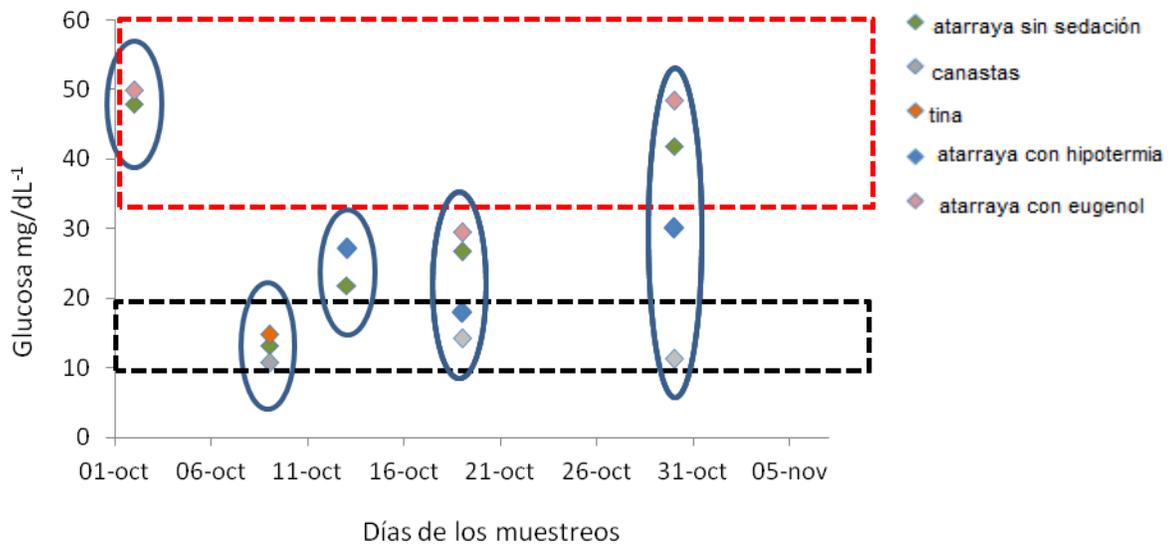


Figura 37.- Valores de glucosa en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. El intervalo enmarcado con la línea punteada negra muestra un rango a la cual pertenecen valores obtenidos en tanque de concreto al exterior en camarones en condiciones basales en las cuales se considera que no hubo o fue mínimo el estrés por captura. Y en rojo valores de estrés Datos basados en (Mercier et al., 2009; Aparicio-Simón et al., 2010; Aguilar et al., 2012).

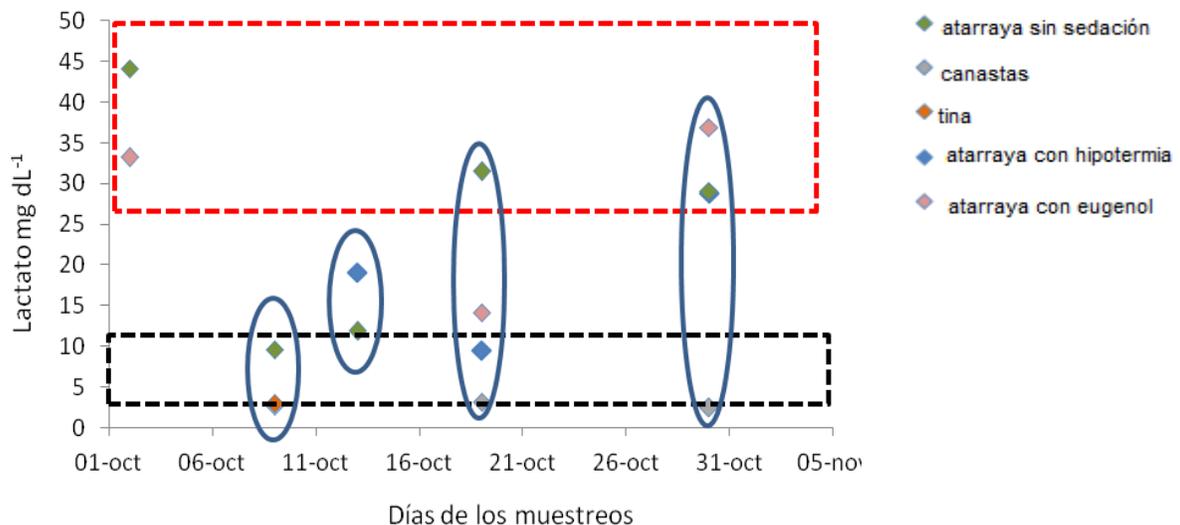


Figura 38.- Valores de lactato en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. Ver figura 15 para más detalles.

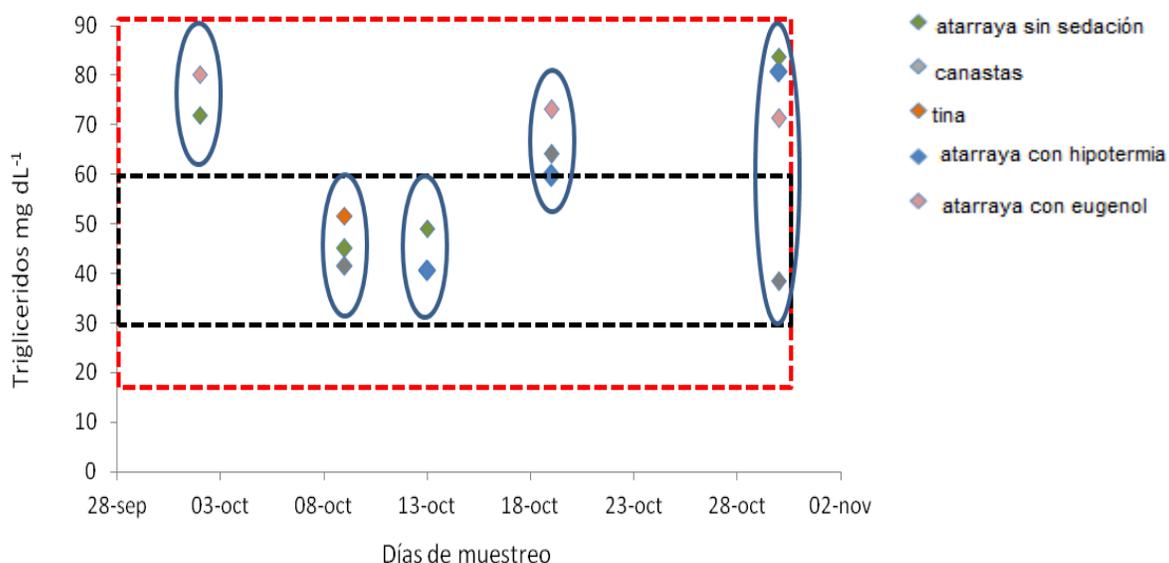


Figura 39. Valores de triglicéridos en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. El intervalo enmarcado con la línea punteada negra muestra un rango a la cual pertenecen valores basales. Y en rojo valores de estrés (ver Tabla XX para más detalles).

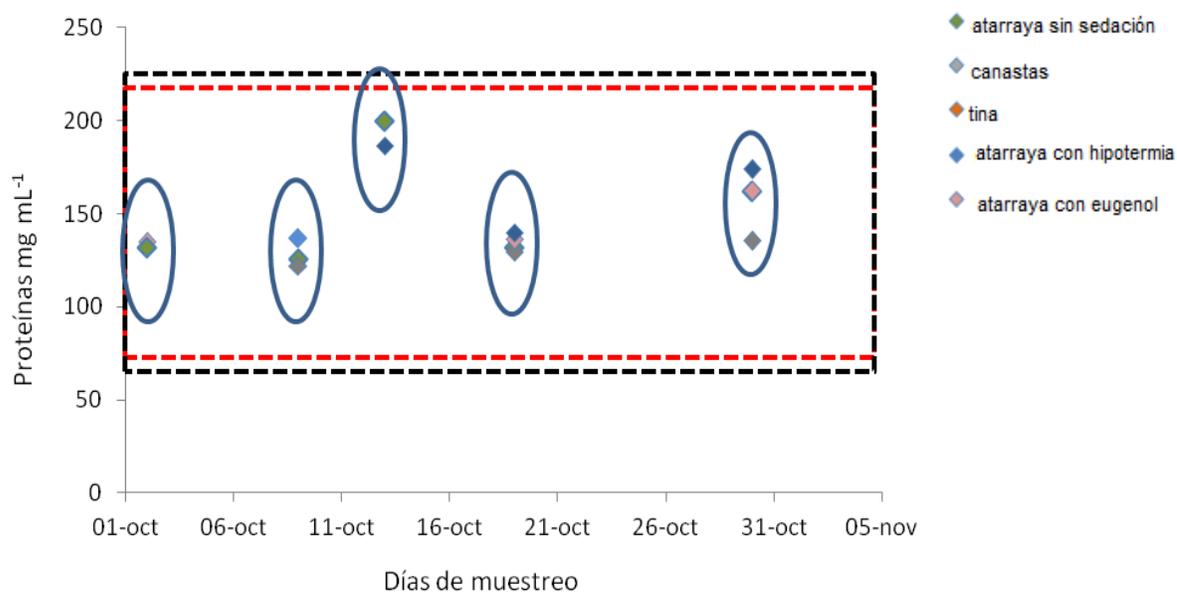


Figura 40.- Valores de proteínas en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. El intervalo enmarcado con la línea punteada negra muestra un rango a la cual pertenecen valores basales. Y en rojo valores de estrés (ver Tabla XX para más detalles).

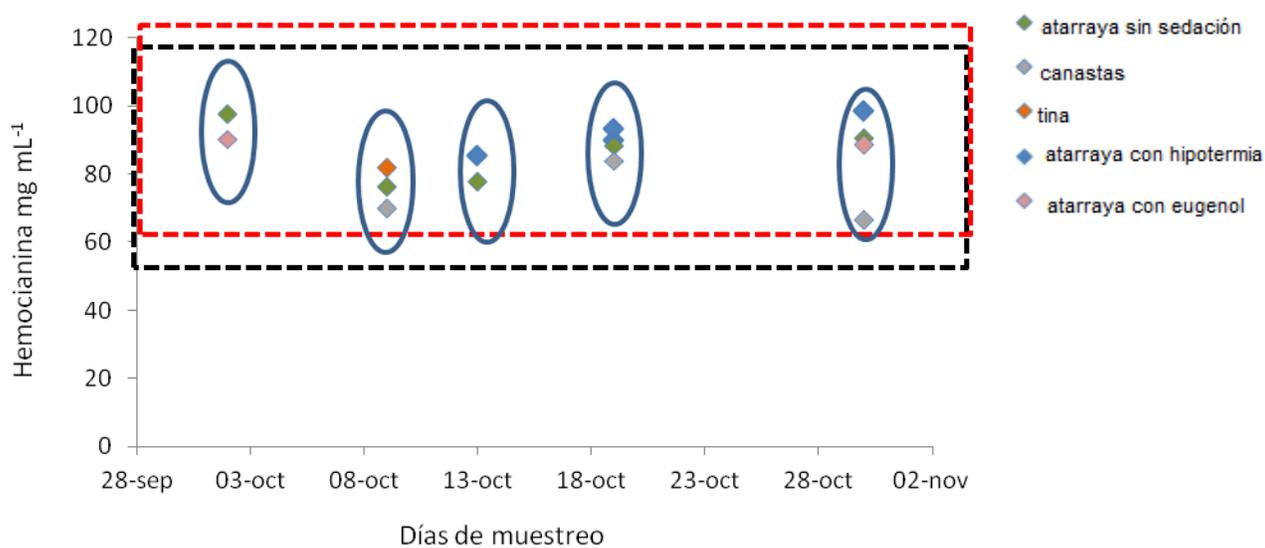


Figura 41.- Valores de hemocianina en hemolinfa para todas las condiciones en todos los muestreos realizados. El intervalo enmarcado con la línea punteada negra muestra un rango a la cual pertenecen valores basales. Y en rojo valores de estrés (ver Tabla XX para más detalles).

### 9.5. Condición atarraya con eugenol

Los organismos acuáticos se estresan fácilmente y las prácticas rutinarias en el cultivo así como algunos manejos para investigación, producen estrés, riesgo de enfermedades y muerte. Por lo tanto la sedación puede ser benéfica en estas prácticas y es necesario el uso de un seguro sedante/anestésico, ecológico y barato. En este sentido el aceite de clavo (que contiene entre 70 a 90 % de eugenol, Coyle et al., 2005) es una alternativa natural a otros anestésicos. Además ya se tiene reportado como eficiente en el uso con crustáceos (*Macrobrachium rosenbergii*, Coyle et al., 2005; *Penaeus semisulcatus*, Soltani et al., 2004; *Fenneropenaeus indicus*, Akbari et al., 2010; *Homerus americanus*, Waterstrat y Pinkahm, 2005). En los ensayos preliminares del presente trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios de anestesia completa (ausencia de respuesta a la estimulación mecánica) con una dosis de 100 a 120 mg L<sup>-1</sup> que se encuentra en el rango de lo reportado en otros trabajo. La correspondencia entre los criterios comportamentales usados en el presente trabajo comparados con la denominación de efecto sedativo y

anestésico considerada por otros autores (Coyle et al., 2004; Soltani et al., 2005; Guzmán.Sáenz et al., 2010), se indican en la Tabla XXI.

**Tabla XXI. Signos y respuestas comportamentales de camarones bajo anestesia por eugenol.**

<b>Condición</b>	<b>Característica comportamental</b>
<b>Sedación</b>	Perdida de nado
<b>Anestesia ligera</b>	Perdida de equilibrio y de movimiento de pleópodos
<b>Anestesia profunda</b>	Ausencia de respuesta a estímulo mecánico

En nuestro caso se deseaba la anestesia profunda sin la muerte de los organismos y por ello se escogió, previa validación, la dosis de 100 a 120 mg L<sup>-1</sup>. Se deseaba un estado de anestesia profundo para evitar cualquier respuesta del camarón a la estimulación por la captura misma así como por la toma de muestra de hemolinfa. Al respecto Soltani et al. (2004) reporta que se alcanza la anestesia profunda en *Penaeus semisulcatus* de 2 g en 5 minutos o menos con una dosis de aceite de clavo entre 100 y 200 mg L<sup>-1</sup>, aunque el efecto depende hasta cierto punto de la temperatura y la salinidad. El langostino *Macrobrachium rosenbergii* requiere al parecer dosis más altas dado que la pérdida total de equilibrio no se alcanza con ausencia de reacción a la estimulación no se alcanza más que con una dosis de 300 mg L<sup>-1</sup> de aceite de clavo en 47 % de los organismos al cabo de 15 min y en un 100 % de los organismos solo al cabo de 45 minutos (Coyle et al., 2005). Finalmente, para *Homarus americanus* la máxima probada fue de 100 mg L<sup>-1</sup> de eugenol puro obteniéndose un efecto de anestesia ligera con ausencia de movimiento al cabo de 5.7 minutos y anestesia profunda con pérdida de equilibrio al cabo de 8.4 minutos en la totalidad de los organismos (Waterstrat y Pinkham, 2005). En cuanto a un efecto letal por permanencia prolongada de una hora como en el presente trabajo, se reporta un 6.7 y un 20 % de mortalidad para las dosis de 110 y 120 mg L<sup>-1</sup> respectivamente para *Penaeus semisulcatus* (Soltani et al., 2004), mientras que para *Macrobrachium rosenbergii*, no se reporta mortalidad alguna al cabo de una hora de exposición aun con una dosis de 300 mg L<sup>-1</sup> (Coyle et al., 2005). En este trabajo no se reportó mortalidad, dado que a pesar de un inmovilidad total, lo camarones

mantenían su actividad cardíaca lo que se considero como el signo vital más evidente de monitorear.

El efecto del eugenol sobre las diferentes variables metabólicas, en comparación con los camarones capturados con atarraya sin sedación fue variable en función de la fecha de muestreo, en particular para los valores de glucosa y lactato en hemolinfa. Lo anterior se debe tanto a la variación temporal ya analizada para los camarones capturados con atarraya sin sedación (ver sección 8.2) como a la variación temporal del propio grupo.

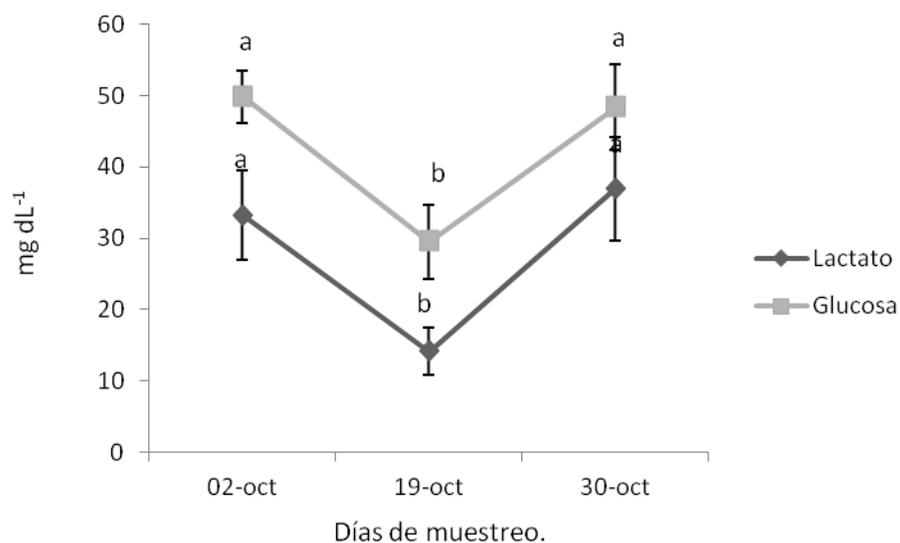


Figura 42.- Valores de glucosa y lactato en las diferentes fechas de muestreo, donde es utilizó la condición atarraya con eugenol.

Es importante señalar en primera instancia las diferencias que hubo de manera particular para el grupo eugenol entre las tres fechas de muestreo que se relaciona con dos aspectos. Se tiene que considerar las diferencias en los valores de oxígeno y temperatura ya reportados en las tablas VI, X, XVI y XVIII, pero que se resumen a continuación para fines de mayor claridad (Tabla XXII).

**Tabla XXXVIII. Valores de oxígeno disuelto (OD) y temperatura en el estanque y en las taras para la condición eugenol en distintas fechas de muestreo.**

Variable	Condición	2 Oct	19 Oct	30 Oct
OD (mg L <sup>-1</sup> )	Estanque	3	4.6	4.8
	Tara (inicial)	1.5	3.9	5.6
Temperatura (°C)	Estanque	27.8	24.4	25.3
	Tara (inicial)	27.8	24.6	26.1

Como se puede apreciar hay una diferencia importante entre el muestreo del 2 de Octubre y los del 19-30 de Octubre que consiste en una menor concentración de Oxígeno disuelto (en particular para el valor inicial en la tara por un mal ajuste de la aeración) y una mayor temperatura. Racotta et al. (2002), analizaron el metabolismo anaeróbico en camarones *Litopenaeus vannamei* expuestos a condiciones de hipoxia (1.5-2.5 mg L<sup>-1</sup>) por un periodo de tres días, observando que los niveles de glucosa en hemolinfa aumentaron de 12.9 a 57 mg dL<sup>-1</sup> en comparación con los organismos del grupo control y un efecto similar se observó en el lactato en hemolinfa con incremento de 8 a 30 mg dL<sup>-1</sup> lo que indica una activación de vías anaeróbicas durante el período de exposición a la hipoxia. Mas corto plazo, Soñanez-Organis et al. (2009) obtuvieron un incremento en los valores de glucosa al cabo de una hora en condiciones de hipoxia de 2.5 y 1.5 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno, alcanzando niveles de 35 y 75 mg dL<sup>-1</sup>, respectivamente, comparado con 16 mg dL<sup>-1</sup> en normoxia. Un efecto similar se observa en el lactato que se incrementa de 10.8 mg dL<sup>-1</sup> a 33 y 39.6 mg dL<sup>-1</sup> al cabo de 1 hora a condiciones de hipoxia de 2.5 y 1.5 mg dL<sup>-1</sup>, respectivamente. Lo anterior coincide con los valores obtenidos en nuestro trabajo para glucosa y lactato de 49 y 36 mg dL<sup>-1</sup> valores promedio de ambas condiciones para la fecha dos de octubre (Fig. 15), lo que podría indicar un estrés por hipoxia a largo plazo en el estanque, donde se registraron valores de 2.3 mg L<sup>-1</sup> el día 2 de Octubre como un estrés agudo en la tara donde se tuvieron valores iniciales de 1.5 mg dL<sup>-1</sup>. El efecto del eugenol es a nivel de canales iónicos, lo cual explica sus efectos finales a nivel nervioso y muscular como la pérdida de sensibilidad, movimiento y equilibrio. Sin embargo, no necesariamente bloqueará una reacción metabólica como la necesidad de glucosa y la producción de lactato lo cual explicaría estos valores tan elevados de glucosa y lactato en hemolinfa el día 2 de Octubre.

Para el 30 de octubre, tal como ya se ha mencionado los organismos tuvieron un estrés adicional con respecto al resto de los muestreos teniendo para la condición eugenol el valor más alto de lactato en hemolinfa ( $37 \text{ mg dL}^{-1}$ ) y también niveles muy altos de glucosa ( $48.3 \text{ mg dL}^{-1}$ ) En este caso, se puede asumir que los organismos se encontraban muy probablemente demasiado estresados cuando se les aplicó el anestésico, dado que estuvieron alrededor de 30 minutos hacinados en la tara sin aeración, mientras se lograba la captura de la totalidad de los organismos.

Habiendo comparado y explicado las diferencias para los valores de glucosa y lactato para el grupo eugenol en distintas fechas, podemos analizar el efecto del eugenol comparado con la captura con atarraya sin sedación. Como ya se menciona para la fecha dos de octubre no se presentaron diferencias significativas por el uso del eugenol posterior a la captura con atarraya, no obstante, en hemolinfa los niveles de lactato de la condición eugenol presenta valores menores que la condición atarraya sin sedación (Tabla IX). Esta ligera atenuación se observó a pesar de la influencia de la hipoxia, por lo cual es factible considerar que el estrés subsecuente a la permanencia de los organismos a lo largo de un periodo de 40 minutos implicó una mayor producción de lactato para el grupo sin sedación que la hipoxia inicial del grupo anestesiado con eugenol. Al no existir esta hipoxia inicial el 19 de Octubre, el eugenol fue efectivo en minimizar el estrés por efecto del muestreo, dado que los valores fueron significativamente menores en un 55 %, respecto a la condición capturados con atarraya sin sedación. Dado que en ambos grupos existe el estímulo estresor inicial de la captura misma, la diferencia radica en los eventos posteriores a la captura. Tal como se mencionó existe una situación de estrés subsecuente posterior durante la permanencia de los organismos en la tara. Lo anterior podría implicar un incremento de lactato durante ese periodo, mismo que ya fue reportado por Racotta y Villarreal (resultados no publicados, ver tabla XIX) aunque en ese caso fue disminuyendo el nivel de oxígeno a lo largo de ese tiempo, lo cual no ocurrió en este trabajo. En cualquier caso dicho incremento al parecer no ocurrió en el grupo tratado con eugenol, lo cual explicaría que se presentaran niveles intermedios entre una condición sin estrés (ver tabla XIX valores basales y tabla XV para valores de organismos no estresados obtenidos de canastas) y la condición de máximo estrés en camarones sin sedación. Alternativamente, podemos especular que si ocurrió el incremento máximo de lactato en los camarones tratados con

eugenol, pero que al no haber ningún movimiento ni reacción a ningún estímulo posteriormente, el lactato producido inicialmente se fue depurando, lo cual se apreció en el grupo sin sedación dado que siguió habiendo producción de lactato.

El efecto atenuador del eugenol sobre el incremento del lactato durante el estrés, concuerda con el incremento en la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en músculo de *M. rosenbergii* después de 30 minutos de manipulación, siendo menor en el grupo tratado con una mezcla de anestésicos (eugenol y mentol) (Saydmohammed y Pal, 2009). La enzima LDH es terminal en la ruta de la glucólisis y responsable de la conversión reversible de piruvato a lactato, por lo cual tanto se espera que incremente en condiciones de estrés. Si bien los niveles altos de lactato han sido reportados en crustáceos bajo distintas situaciones de estrés como el manejo (Aparicio-Simón et al., 2010), la hipoxia aguda y crónica (Racotta et al., 2002) y la infección de camarones con *Vibrio alginolyticus* (Hsieh et al., 2008), es difícil definir en qué condiciones existe participación del sistema neuroendocrino que sea susceptible de bloquearse con el uso de eugenol. Al respecto, se ha sugerido la participación de la hormona hiperglucemiante (CHH) en estimular la glucólisis (Santos y Keller, 1993) y hay evidencia directa de que la serotonina incrementa los niveles de lactato (Racotta y Palacios, 1998), posiblemente a través de la CHH.

En cuanto a la segunda posibilidad sobre la depuración del lactato durante el período de anestesia, se ha sugerido que los camarones peneidos son muy eficientes para su eliminación del músculo hacia la hemolinfa y después de su depuración por gluconeogénesis (Aparicio-Simón et al., 2009). En apoyo a lo anterior, Ellington (1983), reporta que el exceso de lactato se transfiere del músculo hacia la hemolinfa en un intento por disminuir la acidosis tisular, identificándose tres posibles vías para su eliminación: su excreción, su completa oxidación y su conversión hacia sustratos anaerobios (e.g. gluconeogénesis).

Para la glucosa, no se observa atenuación alguna de la hiperglucemia por estrés de captura con atarraya para ninguna de las tres fechas donde se utilizó eugenol como anestésico. Por el contrario, la glucosa tiende a valores más altos en el grupo eugenol comprado al grupo sin sedación, en particular para 30 de Octubre. El incremento de la glucosa en hemolinfa es característico de una respuesta de estrés en crustáceos (Racotta y Palacios,

1998; Racotta et al., 2002; Mungier et al., 2008, Aparicio-Simón et al., 2010). La hiperglucemia por efecto del muestreo en organismos cultivados en estanques litorales ya ha sido reportado como una situación reconocida de estrés (Pascual et al., 2003, Aparicio-Simón, 2009, Racotta y Arcos resultados no publicados, Racotta y Villarreal, resultados no publicados). Dicho incremento de glucosa como parte de la respuesta de estrés se interpreta comúnmente como el poner a disponibilidad este combustible para satisfacer la necesidad de su utilización a nivel metabólico ante un incremento del requerimiento de energía en algunos tejidos como el músculo. Por ende, los niveles de glucosa en hemolinfa dependerán tanto de su producción como de su captación. Así y al igual que para explicar una menor producción de lactato, es probable que durante el periodo de la permanencia en la tara a lo largo del muestreo, hubo mayor captación tisular (v.gr. muscular) de glucosa en los camarones sin sedación como para con los camarones anestesiados con eugenol. Lo anterior ocurrió principalmente el día 30 de Octubre, lo cual se explica porque la magnitud del estímulo estresor por captura fue mayor ese día y en menor grado el día 2 de Octubre dado que a la hipoxia inicial en grupo tratado con eugenol si pudo implicar mayor captación de glucosa. Dado que los efectos no fueron significativos, sería importante poner a prueba esta hipótesis al largo de un periodo de seguimiento mayor y midiendo otros indicadores de la actividad metabólica celular como la actividad de algunas enzimas que controlan el flujo glucolítico.

En general se acepta que la hiperglucemia como respuesta de estrés ocurre principalmente por la utilización del glucógeno almacenado en hepatopáncreas y músculo. Si bien no se observó ninguna diferencia significativa del glucógeno en el hepatopáncreas o músculo, el día 19 de Octubre los niveles de glucógeno en ambos órganos ( $11.4 \text{ mg g}^{-1}$  en hepatopáncreas y  $1.3 \text{ mg g}^{-1}$  en músculo) tienden a ser mayor en camarones anestesiados con eugenol comparado con los camarones sin sedación ( $8.5 \text{ mg g}^{-1}$  en hepatopáncreas y  $0.77 \text{ mg g}^{-1}$  en músculo; Tabla XV). Dado que en el grupo de eugenol fue el de menor estrés inicial, comparado con las otras fechas, es razonable pensar que existió una menor utilización de glucógeno que en los camarones sin sedación ( $8.5 \text{ mg g}^{-1}$  en hepatopáncreas y  $0.77 \text{ mg g}^{-1}$  en músculo) en donde continuo la utilización de esta reserva. Asimismo en los camarones expuestos a eugenol pero en condición de hipoxia inicial (2 de Octubre) o bien cuando el estímulo estresor inicial de captura fue más prolongado (30 de Octubre) los

niveles en hepatopáncreas fueron considerablemente más bajos (5.9 y 6.9 mg g<sup>-1</sup>) que el 19 de Octubre.

#### **9.6. Condición atarraya con hipotermia**

La temperatura es uno de los factores abióticos más importantes que afectan a la supervivencia y el crecimiento de los camarones (Lutterschmidt y Hutchinson, 1997) y puede afectar a numerosos procesos fisiológicos. El principio fundamental de la anestesia por frío en crustáceos, se basa en una reducción de la tasa metabólica a causa de la baja temperatura del agua. Existen muchos trabajos sobre el uso de la hipotermia como anestésico en crustáceos (Salin, 2005; Salin y Jayasree-Vadhyar, 2001) solo algunos reportan valores de metabolitos antes y después del uso de la hipotermia. Si bien se reporta que una disminución de la temperatura en 5 °C (Rosas et al., 2004) o 10 °C (Rosas et al., 2002; Pascual et al., 2003) por debajo de la temperatura del agua del estanque por 5 min reduce la actividad metabólica, prevé que algunos de los metabolitos plasmáticos, como la glucosa y el lactato, sean alterados por la manipulación involucrada en el muestreo, no se presentan evidencias experimentales de este efecto. Por el contrario, Kuo y Yang (1999), con *Macrobrachium rosenbergii* reportan un incremento en la glucosa que estaría reflejando el proceso de compensación fisiológica ante un choque de temperatura. La magnitud del aumento en la concentración de glucosa tiene una relación directa con el grado de disminución de temperatura, y se observa que una disminución en tan solo de 5 °C incrementa la glucosa de a 39 mg dL<sup>-1</sup>, al cabo de 30 min.

En este trabajo y al igual que para la anestesia con eugenol, el efecto dependió de la fecha de muestreo, por lo cual se analizará inicialmente la variación en diferentes fechas. La evaluación del efecto de la hipotermia se realizó los días 13, 19 y 30 de Octubre. El día 13 de Octubre fue ocho días después del evento de hipoxia, lo cual resultó en niveles mayores tanto de glucosa como de lactato, aunque no significativamente, comparado con los valores obtenidos el 19 de Octubre. Esto resultó contrario a la tendencia observada para el grupo de camarones capturados con atarraya sin sedación para los cuales los niveles de glucosa fueron significativamente mayores el 19 de Octubre, aunque el efecto tampoco fue significativo. Por lo anterior, es difícil atribuir el incremento a la hipoxia ocurrida una

semana antes en el estanque, dado que los valores de los metabolitos (lactato y glucosa) ya deberían haberse restablecido a sus niveles basales, como menciona Aparicio-Simón (2010). Si bien no existe explicación alguna para este efecto, los valores más altos de la fecha 13 de octubre, podrían enmascarar el uso de hipotermia como un anestésico confiable para camarones, tal como se discutirá más adelante.

El día 19 de Octubre representa el día más estable dado que ya habían pasado dos semanas desde el evento de hipoxia y no se detectó ningún otro factor de variación. En contraste, para el 30 de Octubre, hubo un estrés adicional por la captura prolongada que muy probablemente explicaría los niveles significativamente mayores de lactato, con la misma tendencia para glucosa. En cualquier caso y al igual que para el tratamiento con eugenol, ya no tiene sentido evaluar el posible efecto sedativo de la hipotermia ese día.

Al analizar el posible efecto atenuante del estrés por captura en términos de glucosa y lactato, se observa que existe cierta atenuación únicamente el día 19 de Octubre con niveles significativamente menores del lacto para el grupo sometido a hipotermia y una tendencia similar pero no significativa para glucosa, estos resultados validarían el posible uso de hipotermia como procedimiento sedativo para evitar la respuesta metabólica de estrés inducida por la captura. Sin embargo, el efecto no parece ser del todo consistente dado que el 13 de Octubre el efecto es incluso contrario con valores incluso más altos para hipotermia que para la condición sin sedación. Tal como se menciono anteriormente, no se tiene un explicación de los valores más altos de glucosa y lactato en la condición de hipotermia para esta fecha pero en cualquier caso, este procedimiento al parecer está representando un estímulo estresor adicional más que un anestésico para los organismos. Lo anterior estaría más bien a favor de un efecto de hiperglucemia producido por shock térmico (Kuo y Yang, 1999) lo cual a su vez estaría resultando en la utilización de esta glucosa con la subsecuente producción de lactato.

A pesar de proponer el procedimiento de hipotermia, Pascual et al. (2003) reduciendo la temperatura del agua 10 °C por debajo de la temperatura ambiente del estanque, reporta valores de glucosa de 28 y 38 mg dL<sup>-1</sup> en condiciones de laboratorio y estanques externos, respectivamente. No obstante, estos valores podrían considerarse altos si se compara con otros trabajos, tal como se discutió anteriormente al analizar valores basales y de estrés en distintos trabajos (Tabla XIX).

Con estos resultados y antecedentes, es necesario establecer claramente en qué condiciones el procedimiento de hipotermia podría ser funcional o no, diseñando experimentos específicos para ello en relación a la velocidad de cambio de temperatura, tipo de estímulo estresor, temperatura inicial, tiempo que han durado bajo esta condición, entre otros factores.

En cuanto a tejidos no se presentan diferencias significativas para ninguna fecha. Por estrés de captura, se esperaba una movilización de reservas en algunos tejidos lo que debería traducirse en la disminución de algunos componentes (e.g. glucógeno) y por ende al atenuar esta respuesta podríamos obtener niveles mayores de algunos de estos componentes, lo cual no se apreció.

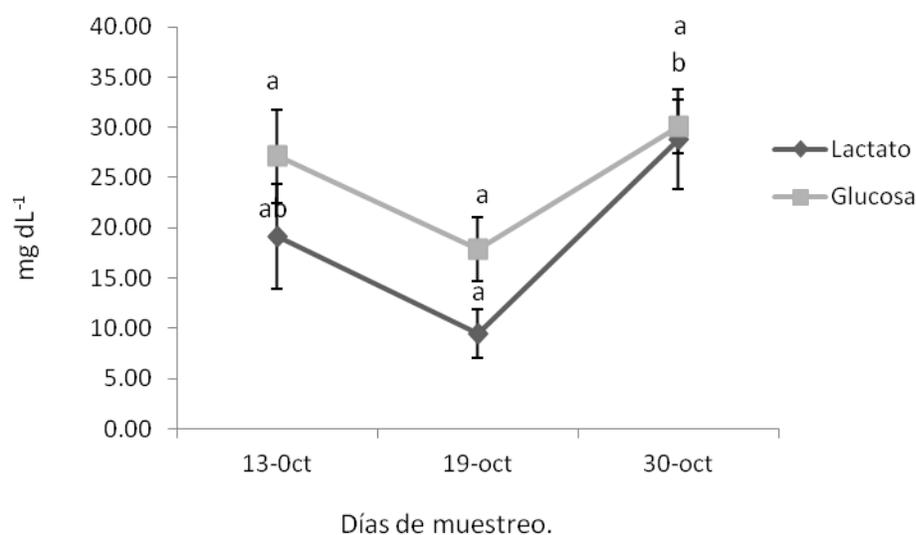


Figura 43.- Valores de glucosa y lactato en las diferentes fechas de muestreo, donde se utilizó la condición atarraya con hipotermia.

### 9.7. Condición atarraya con aislamiento (canastas y tina) y recuperación

En cuanto a la condición aislamiento (canastas y tina), como ya se mencionó estos organismos fueron aislados aproximadamente 15 horas antes del muestreo, esta condición en particular presenta un ayuno mejor controlado que el que presentaron los organismos de

las otras condiciones ya que los camarones en la condición canastas permanecieron en la superficie del estanque en donde solo se encuentra una pequeña porción de alimento vivo (fitoplancton y partículas en suspensión) que puede ser consumido por el camarón. Para la condición tina, se utilizó agua del mismo estanque, por lo cual se puede considerar que la disponibilidad de alimento fue muy similar a la de la condición canastas a base de fitoplancton y partículas en suspensión. Se considera que 12 horas de ayuno antes de la toma de muestra evita la interferencia de los nutrientes de los alimentos en los metabolitos sanguíneos (Rosas et al., 2001). Estas condiciones de aislamiento (canastas y tina) fueron las que presentaron las concentraciones más bajas de glucosa y lactato en hemolinfa en todas las fechas que fueron utilizadas, con valores promedio de 12.7 y 2.8 mg dL<sup>-1</sup> respectivamente.

Los valores obtenidos de glucosa y lactato en los distintos días de muestreo muestran mínima variación (fig. 22), por lo cual podemos asumir que los factores que afectaron estas variables en los otros grupos no tuvieron mayor impacto si los organismos se encontraban previamente aislados. Por otro lado los valores obtenidos en general en estas condiciones indican que los organismos no presentaron estrés por efecto del muestreo dado que son similares a valores basales obtenidos en condiciones de laboratorios (tabla XIX). Al analizar el proceso de muestreo de estos organismos, tanto de tina como de canasta, podemos considerar que su captura fue relativamente fácil en menos de 5 segundos, la obtención de hemolinfa y el pesado se llevo a cabo en menos de 30 segundos, después de lo cual los organismos fueron congelados inmediatamente. Ello implica mucho menor grado de manipulación y de estrés comparado con los organismos capturados con atarraya por lo cual las diferencias encontradas entre ambos grupos por un lado indican claramente la atenuación en la respuesta de estrés en las variables más claramente identificadas como la glucosa y el lactato, y en segundo lugar se pueden caracterizar otro tipos de respuestas potenciales.

Para el caso de la glucosa, tanto el 19 como el 30 de Octubre se observó que el incremento producido por el estrés de captura fue atenuado por el aislamiento previo de los organismos en canastas por lo que podríamos considerar que estos últimos presentan valores basales mientras que los capturados con atarraya son valores de estrés. Podemos

considerar lo mismo para lactato, aunque en este caso, y a diferencia de la glucosa, las diferencias entre ambos grupos fueron observadas aun el día 13 de Octubre.

Según Aparicio-Simón et al. (2010), organismos sometidos a manipulación durante un minuto, presentan un incremento significativo en los niveles de glucosa de 15 a 45 mg dL<sup>-1</sup> en 60 min después del agente estresante y vuelven a niveles basales a los 240 min. Por el contrario, los niveles de lactato incrementaron de 4 a 10 mg dL<sup>-1</sup> en 10 min y hasta 18 mg dL<sup>-1</sup> a los 30 min, a partir de entonces, los niveles disminuyen progresivamente a los valores basales. Así la glucosa y el lactato presentan un lento aumento progresivo, después del evento de estrés. En caso del aislamiento en la condición canastas y tina, el tiempo de manipulación fue muy corto y no ocurrió el incremento de estos metabolitos como respuesta fisiológica al estrés.

Racotta y Palacios, (1998) también observaron un incremento de glucosa y lactato por la toma repetida de muestras e inyección de serotonina en camarón blanco. Sin embargo la inyección de solución salina también presentó un incremento significativo de glucosa 30 min después, con lo cual se concluye que la hiperglucemia observada en el tratamiento de solución salina, indica el efecto del estrés causado por la inyección y el muestreo de hemolinfa.

Adicionalmente a la movilización de glucosa para que este combustible esté disponible en hemolinfa y a la producción de lactato a la hemolinfa para su depuración, también se esperaba una movilización de reservas en algunos tejidos lo que debería traducirse en la disminución de algunos componentes (e.g. glucógeno) en músculo y/o hepatopáncreas. Así, Saydmohammed y Pal (2009), observaron que en, *Macrobrachium rosenbergii*, los niveles de glucógeno revelaron una tendencia inversa a la de la glucosa en el caso de organismos sometidos a estrés por manipulación (captura cada 2 min durante 30 min). Si bien los niveles de glucógeno en camarones aislados tendieron a ser mayores en músculo los días 13 y 19 de Octubre y en hepatopáncreas, el día 30 de Octubre, las diferencias no fueron significativas con respecto a los camarones capturados con atarraya. Por otro lado, Xiaoming et al. (2009), obtuvieron un incremento en la concentración de lactato en plasma de 10 a 20 mg dL<sup>-1</sup> por nado prolongado y de 10 a 37 mg dL<sup>-1</sup> por la respuesta de escape. Dicho incremento estuvo acompañado por la disminución en el

glucógeno del hepatopáncreas así como del músculo de los pleópodos en caso del nado y del músculo abdominal en caso de la respuesta de escape. En contraste los niveles de glucosa, triglicéridos y proteínas totales en plasma no fueron significativamente diferentes del grupo control. Las diferencias encontradas entre nuestro trabajo y el trabajo de Xiaoming et al. (2009) podrían explicarse por el tiempo de muestreo. Aunque no se especifica el tiempo transcurrido entre el inicio de la actividad física (nado o respuesta de escape) y la toma de muestra en el trabajo de Xiaoming et al. (2009), es posible que el muestreo haya sido antes del incremento de glucosa, de acuerdo al tiempo mínimo reportado por Aparicio-Simón et al. (2010) para observar esta respuesta al cabo de 30 minutos. En caso del glucógeno, es posible que el tiempo tal vez haya sido muy prolongado en nuestro caso para observar la repuesta o bien que la intensidad de la actividad haya sido menor en nuestro trabajo en comparación a la fatiga por nado o por repuesta de escape del trabajo de Xiaoming et al. (2009).

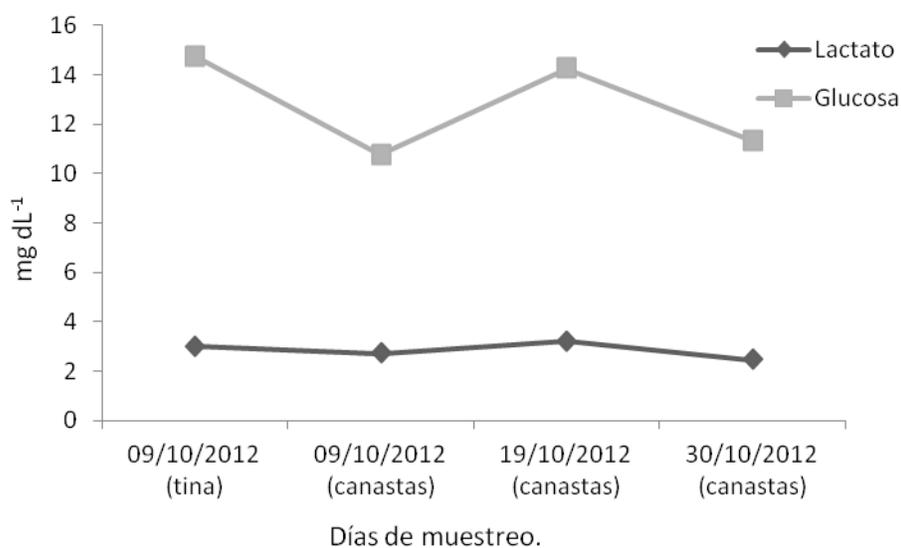


Figura 44.- Valores de glucosa y lactato en las diferentes fechas de muestreo, donde es utilizó la condición canastas y tina.

Por último, una vez más se debe considerar que los estanques litorales tienen cierta cantidad de flora/fauna asociada lo que representa alimento natural disponible para el organismo, aunque se eliminó el último suministro de alimento peletizado el día anterior

(16 horas antes del muestreo). Dadas las condiciones de aislamiento en tinas y en canastas, es posible que algunas diferencias se deban a la disponibilidad de alimento. En el experimento de comparación ayuno vs. alimentados, no se obtuvieron diferencias por la presencia o no de alimento desde 16 horas antes del muestreo, no se obtuvieron diferencias para ninguna de las variables analizadas. Es necesario sin embargo recordar que el alimento peletizado es consumido en las primeras horas, mientras que el alimento natural está constantemente disponible para los organismos. Así, no se tiene control sobre la posible ingesta de alimento por parte de los organismos del estanque poco antes del muestreo lo cual podría afectar las variables analizadas. Es necesario recordar que uno de los requisitos para la evaluación de metabolitos sanguíneos en animales experimentales es que estos permanezcan en ayuno por lo menos 12 horas antes de realizar las mediciones, con el fin de evitar la interferencia que el alimento recién consumido provoca en los niveles sanguíneos de estos (Rosas et al., 2002). Por esta razón, se ha observado que para los estanques externos se presenta una mayor dispersión de valores en la distribución de frecuencias indicando una mayor variabilidad en los metabolitos en estos animales en comparación con el comportamiento de datos observado en animales mantenidos en condiciones de laboratorio (Rosas et al., 2002).

La posible influencia que pudo haber tenido la tasa de ingestión de alimento no controlada en este trabajo fue una mayor dispersión en los valores de glucosa en hemolinfa, aunque es probable que esta variación también resulte de una magnitud diferencial de la repuesta de estrés relacionada a su vez con la variabilidad individual (susceptibilidad al estrés, grado de respuesta física de escape, tiempo transcurrido desde el estímulo inicial, entre otros factores). El grado de alimentación también pudo haber influenciado los niveles de varios componentes a nivel tisular lo cual pudo haber enmascarado algunos de los efectos propios del estrés. Por ejemplo, tanto el ayuno como el estrés disminuyen el glucógeno lo cual pudo haber evitado que se observen diferencias entre el grupo aislado (ayuno) y el capturado con atarraya (estrés).

## **9.8. Carga energética adenilica y Arg-P para las fechas 9 y 19 de octubre**

La primer fecha de muestreo en donde se analizaron la CEA y Arg-P, fue la del 19-octubre-2010 esto porque es la única fecha donde se encuentran las cuatro condiciones más importantes que se utilizaron en los cinco muestreos y por que fue la fecha con menos problemas al momento del muestreo dado que ya había pasado tiempo después del evento de hipoxia (5 octubre) y no se introdujo un estrés adicional en la captura de los organismos (30 octubre).

La carga energética adenilica ó CEA se define como la energía metabólica potencialmente disponible a partir del depósito de adenilato para un organismo en el momento del muestreo (Atkinson y Walton, 1967; Atkinson, 1968). Según Atkinson (1968), las células, tejidos, órganos y organismos deben de mantener un equilibrio entre la síntesis y la degradación de ATP que se refleja en la CEA. Sin embargo, esta armonía puede alterarse en ciertas situaciones del ciclo de vida, como por ejemplo en condiciones de estrés para el organismo. En consecuencia la CEA constituye un indicador del estado energético celular y por ende de la capacidad de respuesta de un organismo durante procesos normales del ciclo de vida.

En el proceso de cultivo de camarones peneidos, se pueden presentar alteraciones en la homeostasis energética de los organismos, por múltiples factores ya sean intrínsecos o extrínsecos. La homeostasis energética es esencial para asegurar una buena condición fisiológica en procesos normales del ciclo de vida o situaciones impuestas por el cultivo mismo.

En el cultivo de camarones peneidos es necesario la realización de biometrías para llevar un seguimiento de los organismos y su estado de salud, no obstante durante este tipo de muestreos se puede contribuir a un desbalance energético por el proceso mismo del muestreo, desconociéndose esta variabilidad presente.

En el presente trabajo para la fecha 19 de octubre lo que se obtuvo fueron niveles bajos en las reservas de Arg-P para las condiciones atarraya sin sedación y atarraya con hipotermia y con niveles intermedios para la condición de aislamiento en canastas si se

compara con la condición atarraya con eugenol (fig. 13). En cuanto a los nucleótidos se presenta un efecto equivalente (fig. 12).

Estos resultados contrastan con las diferentes variables metabólicas, dado que la anestesia con eugenol no mengua el incremento de glucosa y lactato observado en hemolinfa, en comparación con los camarones de la condición canastas para esta fecha en particular (Tabla XV). Tal como ya se expuso el efecto provocado por la atarraya como por la obtención de muestras del camarón (hemolinfa y tejido) que impulsa la respuesta secundaria de estrés por lo cual se elevan estos metabolitos en hemolinfa, en las condiciones donde se utilizó atarraya para la adquisición de los organismos (sin sedación, hipotermia y eugenol). Gäde (1983) señala que en el caso de la respuesta de escape la demanda energética aumenta, lo cual tiene que ser compensado por un mayor aporte de energía al sistema lo cual implica una alta utilización de reservas energéticas y que la demanda de oxígeno sea mayor que la entrega del mismo o que la concentración de este en los tejidos.

Según Albalat et al. (2009), el método de captura afectó a la langosta *Nephrops norvegicus* obteniendo valores más altos de ATP en organismos capturados con jaulas (Creel), mientras que en organismos donde se utilizó un método de arrastre se obtiene una disminución muy marcada de ATP y se observa que el AMP es el principal nucleótido, resultando en una CEA más baja.

Lo anterior concuerda con los valores obtenidos en el presente trabajo para las condiciones donde se utilizó atarraya como método de captura (sin sedación e hipotermia). Sin embargo la condición eugenol no presenta este efecto, posiblemente porque una vez capturados los organismos con atarraya, son inmovilizados por el efecto anestésico del eugenol por lo cual no se tiene gasto de energía por movimientos musculares durante el proceso de obtención de muestras, período en el cual se recuperan los niveles de CEA y fosfágenos.

Según Arnott et al. (1998 y 1999), los crustáceos de la clase Malacostraca como las langostas, los langostinos y los camarones realizan la locomoción de tres formas, el nado, el caminar y contracción de músculo abdominal, esta última principalmente se produce como

una respuesta de escape, entre otros eventos. Newland et al. 1992, han demostrado que durante la captura de langostas *Nephrops norvegicus* por parte de redes de arrastre provocan en el organismo una serie de rápidos movimientos como una conducta de escape. Xiaoming et al. 2009 menciona que la contracción del músculo abdominal en camarón *Marsupenaeus japonicus* es un tipo de actividad física anaeróbica lo anterior implica el uso de las reservas de fosfágenos para la producción de ATP y cuando estos se agotan se activa el metabolismo anaeróbico. Para otros decápodos, se ha demostrado que este mecanismo es apoyado por el metabolismo anaeróbico que resulta en un desgaste de Arg-P seguido por la glicólisis con el fin de mantener los niveles de ATP (England y Baldwin, 1983; Onnen Zebe, 1983; Field et al., 1991, citados por Albalat et al., 2009). Sin embargo, la glucólisis anaeróbica no es una forma eficiente de producir ATP y por lo tanto los niveles de ATP pueden descender y el AMP incrementar, ocurriendo un desbalance energético, el cual ya ha sido observado por Mendes et al. (2001) en la langosta *Nephrops norvegicus*.

Con respecto a las concentraciones altas por un lado de lactato y por otro de la Arg-P en músculo de organismos que se encontraban dentro de la condición atarraya con eugenol, comparada con la condición de canastas. Morris y Adamczewska (2002), han documentado que después de un evento donde acontecen contracciones del músculo abdominal, la restauración de los fosfatos de alta energía y las reservas de oxígeno generalmente se llevan a cabo en menos tiempo que la remoción del lactato. Es muy probable que esto esté sucediendo en la condición atarraya con eugenol del presente trabajo ya que los valores de Arg-P son los más altos de las condiciones utilizadas (fig. 13) y el lactato de igual forma es elevado ya que su remoción tarda más tiempo (tabla XV).

Las concentración de CEA en músculo de organismos bajo condiciones de atarraya con eugenol presentó solo 4 % más que para la condición canastas, sin embargo para atarraya sin sedación y atarraya con hipotermia la diferencia fue de 13 y 9 % mayor en la condición eugenol. Y aunque la condición que presentó el valor más bajo de CEA es el de atarraya sin sedación (0.85) este valor sigue siendo elevado. Según estudios de Atkinson (1968) y Chapman et al. (1971) indican que la CEA de organismos en sus ambientes normales debe oscilar entre 0.8 y 0.9.

Estos valores de CEA se mantienen relativamente elevados para todos los grupos experimentales pese a su exposición a corto plazo, gracias a la utilización de Arg-P y del metabolismo anaeróbico. Así las reservas de fosfágenos menguaron muy bien el estrés inicial, observándose una disminución notable de estos (fig. 13), teniéndose que solo en la condición atarraya con eugenol un gasto menor de estos fosfágenos presentó el valor más alto ( $51.5 \mu\text{moles g}^{-1}$ ), siendo un 60, 74 y 76 % mayor que canastas, hipotermia y atarraya sin sedación. Así, se encontró que la CEA se mantuvo aún cuando los organismos alcanzaron cierto agotamiento, y que la Arg-P y el metabolismo anaerobio permitieron la obtención de energía durante las contracciones.

Hay que considerar además que inmediatamente después de la obtención de los organismos del estanque estos fueron colocados en sus distintas condiciones con aeración y agua del mismo estanque, sin ser perturbados salvo por la obtención de los mismos organismos de cada condición y la obtención de muestras (hemolinfa y tejido), por lo que también podemos considerar que la CEA disminuye en mayor grado por la captura misma y después se fue recuperando durante el período de muestreo.

Según Baldwin et al. (1999) durante el trabajo muscular, el metabolismo anaerobio está limitado por las características de las células del músculo por lo que algunos de los factores limitantes son el tamaño de las reservas de los fosfágenos y del glucógeno así como la sensibilidad de los productos del metabolismo anaerobio. Según Ellington (2001), los organismos que presentan las mayores concentraciones de Arg-P en los músculos del abdomen son los camarones y las langostas, de acuerdo a su actividad muy intensa.

Con respecto al objetivo inicial del trabajo en cuanto a obtener valores basales que no representen una respuesta de estrés por la captura con atarraya, se deberían considerar los valores más altos de CEA y Arg-P dado que, tal como ya se expuso estas disminuciones son por la captura misma. Lo que se puede observar de los resultados es que si bien la condición canastas presenta el segundo valor más elevado de CEA y Arg-P, concordando esto con los valores de los metabolitos bioquímicos existe una relación de un mínimo estrés por efecto del muestreo, ya que estos metabolitos no se incrementan al no utilizarse la atarraya como método de captura, obteniéndose así los valores más confiables de química de hemolinfa y de indicadores bioenergéticos a nivel tisular (carga energética y

niveles de reservas) en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* dentro de un cultivo intensivo por lo que de esta forma se puede formar una idea del estado de salud de los organismos. Si bien podríamos considerar de manera global el procedimiento de canastas como el idóneo para la obtención de valores basales, los resultados indican que al parecer por la cuantificación de Arg-P si habría que considerar la posibilidad de usar eugenol como alternativa. De hecho este procedimiento de uso de anestesia podría ser el indicado cuando se pretenda manipular al organismo en cualquier condición (estanque o laboratorio) para la obtención de peso corporal, muestras de hemolinfa y corte del cefalotórax. Así, sería importante analizar si la manipulación implícita altera los niveles de Arg-P y si es posible prevenir o atenuar esta alteración por el uso de eugenol.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Albalat et al. (2009), en donde utilizaron un método de captura por pesca de arrastre durante 15 min para capturar langosta *Nephrops norvegicus*, produciéndose una caída del ATP en el músculo y una disminución significativa del pH. Paralelamente también se observó la disminución de Arg-P y la glicólisis había comenzado, ya que los niveles L-lactato se habían incrementado en el músculo mientras que los de glucógeno disminuyen. En contraste los organismos capturados con cestas lograron mantener niveles elevados de ATP y glucógeno muscular, aunque se observó una disminución no significativa de la Arg-P y un incremento significativo de lactato en hemolinfa, cuando se compara con langostas no perturbadas.

Un segundo análisis de CEA y Arg-P se realizó para la fecha 9-octubre-2010, se eligió esta fecha por que fue la más cercana al evento de hipoxia que acarrió una gran mortandad de los organismos en el estanque, por lo cual se pretendió evaluar una potencial condición post-estrés crónico. Esta fecha presenta tres condiciones, atarraya sin sedación, canastas y tina.

Lo que se puede observar primeramente en los resultados es que el valor de CEA de la condición canastas es un poco menor para el 9 de octubre (0.84) que para el 19 de octubre (0.92), sucede lo mismo con la Arg-P (16 y 20  $\mu\text{moles g}^{-1}$ ). Para la condición atarraya sin sedación hay un efecto similar aunque más pronunciado con valores de CEA de 0.69 y 0.85 y de Arg-P de 2.5 y 12  $\mu\text{moles g}^{-1}$  para las fechas 9 y 19 de octubre respectivamente. En cuanto a la condición tina se presenta el valor más alto de CEA (0.89)

y el segundo más alto de Arg-P ( $17 \mu\text{moles g}^{-1}$ ), sin embargo no se puede comparar con otra fecha ya que fu el único día que se utilizó esta condición.

Lo anterior indica que el estrés de hipoxia en todo el estanque sí afecto estos indicadores, haciéndolos buenos candidatos para la detección de este tipo de eventos. Se requieren más trabajos puntuales en condiciones de estanques en relación a eventos naturales de estrés ambiental y fisiológico que están ocurriendo.

Por otro lado y al igual que para la fecha 19 de octubre, se observa una disminución de la CEA y Arg-P por la captura con atarraya con respecto a otros métodos de aislamiento Sin embargo algo que se puede resaltar en esta fecha son los valores de los metabolitos en hemolinfa tan bajos, los cuales no se modificaron pese a la condición. Lo cual nos sugiere que los organismos no hicieron uso del metabolismo anaeróbico para la obtención de energía ya que los valores de lactato y glucosa permanecen bajos. Sin embargo la Arg-P si presenta una fuerte caída. Una posibilidad de lo que está ocurriendo como estrategia para tal perturbación como lo fue la hipoxia por la que acaban de pasar los organismos, es una depresión metabólica la cual es un mecanismo muy común utilizado por los animales para hacer frente al estrés ambiental.

Como la glucólisis anaeróbica produce un rendimiento bajo de ATP, en comparación con la respiración aeróbica, hay dos estrategias que pueden seguir para mantener la carga energética durante la anoxia: el primero es el aumento de la velocidad de la glucólisis (estrategia glucolítica) y el segundo es la reducción en la actividad de los procesos que consumen energía (estrategia de la depresión metabólica) (Lutz y Nilsson, 1997; Nilsson, 2001; citados por Silva-Castiglioni et al., 2011).

El proceso de depresión metabólica es capaz de reducir la demanda de energía durante la anoxia, por lo que se establece un nuevo equilibrio entre la producción y el consumo anaeróbico de ATP durante este período (Hochachka et al., 1996; Hochachka y Lutz, 2001; Storey, 1996; Storey, 2002; citados por Silva-Castiglioni et al., 2011).

## 10. CONCLUSIONES

- La respuesta secundaria (metabólica) de estrés por captura con atarraya se caracterizó principalmente por un incremento de glucosa y lactato en hemolinfa, así como de una disminución de carga energética adenilica (CEA) y fosfato de arginina (Arg-P) en músculo.
- La naturaleza de esta respuesta fue variable en función de las condiciones del estanque, como por ejemplo una situación previa de estrés por hipoxia que disminuyó la magnitud de la respuesta de estrés por captura con atarraya en términos de incremento de glucosa y lactato.
- Los resultados indican que la condición aislamiento por el uso de canastas dentro del mismo estanque, mitigaron significativamente la respuesta secundaria (metabólica) de estrés en términos de las variables arriba mencionadas.
- Las condiciones donde se uso sedación por hipotermia o anestesia con eugenol, atenuaron solo de manera parcial la respuesta metabólica de estrés, lo cual a su vez dependió del tipo de variable analizada así como de las condiciones del estanque.
- La utilización de energía celular disponible, inferida a partir de la CEA y los niveles de Arg-P, asociada a la respuesta de escape fue atenuada en mayor grado por el tratamiento con eugenol, de acuerdo al efecto de inmovilización de este anestésico.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Medina, V. 2009. Efecto del ácido araquidónico sobre la susceptibilidad al estrés por alta densidad, la producción de PGE<sub>2</sub> y la respuesta inmune del camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz B.C.S. México.
- Aguilar, V., Racotta, I., Goytortúa, E., Wille, M., Sorgeloos, P., Civera, R. y Palacios, E. 2012. The influence of dietary arachidonic acid on the immune response and performance of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at high stocking density. *Aquaculture Nutrition*. 1-14
- Albalat, A., Gornik S.G., Atkinson R.J.A., Coombs G.H. y Neil D.M. 2009. Effect of capture method on the physiology and nucleotide breakdown products in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). *Mar. Biol. Res.* 5: 450.
- Akbari, S., Khoshnod M. J., Rajaian H. y Afsharnasab M. 2010. The Use of Eugenol as an Anesthetic in Transportation of With Indian Shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) Post Larvae. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 10: 423-429.
- Aparicio-Simón, B. 2009. Respuestas neuroendocrina y metabólica de estrés por manipulación e hipoxia en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz B.C.S. México.
- Aparicio, B.S., Piñón M., Racotta R. y Racotta I. S. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture* 298: 308-314.
- Arnott, S.A., Neil, D.M. y Ansell, A.D. 1998. Tail-flip mechanism and size-dependent kinematics of escape swimming in the brown shrimp *Crangon crangon*. *J. Exp. Biol.* 201: 1771–1784.
- Arnott, S.A., Neil D.M. y Ansell A.D. 1999. Escape trajectories of the brown shrimp *Crangon crangon*, and a theoretical consideration of initial escape angles from predators. *J. Exp. Biol.* 202: 193–209.
- Atkinson, D. E. y Walton, G.M. 1967. Adenosine triphosphate in metabolic regulation. *J. Biol. Chem.* 242: 3239-3241.
- Atkinson, D. E. 1968. Citrate and the citrate cycle in the regulation of energy metabolism. *Biochem. Soc. Symp.* 27: 23--40

- Auro, O. A. y Ocampo C. L. 1999. Diagnóstico del Estrés en Peces. *Veterinaria México*. 30 (4): 337-344.
- Baldwin, J., Gupta, A. e Iglesias, X. 1999. Scaling of anaerobic energy metabolism during tail flipping behaviour in the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. *Mar. Freshwater Res.* 50: 183–187.
- Barclay, M.C., Dall W., Smith S.M. 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68: 229–294.
- Barton, B. A. e Iwama, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1: 3-26.
- Bonilla, G. J. L. 2009. Estatus fisiológico y descripción cuantitativa de la frecuencia de muda como indicador del crecimiento del camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) en organismos silvestres y en proceso de domesticación. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 111pp.
- 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.
- Buckup, L., Dutra B.K., Ribarcki F.P., Fernandes F.A., Noro C.K., Oliveira G.T. y Vinagre A.S. 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 149: 59–67.
- Carreño-Mejía, A. 2009. Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 115pp.
- Carreño, D. P. L. 2000. Alteraciones metabólicas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en respuesta a la manipulación rutinaria bajo condiciones de cultivo y a la ablación del tallo ocular. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur, México. 113 pp.
- Ceballos, J. B., López J. G., Lamela L. E., Magaña C. F. y Villasante V. F. 2008. Traslado de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) a diferentes tiempos, salinidades y densidades y su efecto en la supervivencia y algunos marcadores bioquímicos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43 (3): 681-686.

- Chan, S. M., Rankin, S. y Keeley, L. 1988. Characterization of the moult stages in *P. vannamei*: Setogenesis and haemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *The Biological Bulletin* 175: 185-192.
- Chang, E. S. y O'Connor J. D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Mantel LH (ed) *Internal anatomy and physiological regulation*. Academic Press, New York. 263-287.
- Chang, E. S. 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 193: 1-14.
- Chapman A. G., Fall L. y Atkinson D. E., 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.* 108: 1072-1086.
- Chen, J.C., Chen C.T. y Cheng S.Y. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110: 85-94.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y. y Chen C. T. 1994. Changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 109 A: 339-347.
- Cheng, W., Liub Chun-Hung, Yanb Da-Fun, y Chenc Jiann-Chu. 2002. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. *Aquaculture.* 211: 325-339.
- Chung, J. S., Dircksen, H. y Webster, S. G. 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 13103-13107.
- Chung, J. S. 2010. Hemolymph ecdysteroids during the last three molt cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 73: 1-13.
- Chrousos, G. P. y Gold, P. W. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. In: *Overview of physical and behavioral homeostasis*. *Journal of the American Medical Association.* 267:1244-1252.
- Clifford, H.C. y Brick, R.W. 1983. Nutritional physiology of the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). I. Substrate metabolism in fasting juvenile shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 74B: 561-568.

- Coyle, S. D., Dasgupta S., Tidwell H. J., Beavers T., Bright A. L. y Yasharian K. D. 2005. Comparative Efficacy of Anesthetics for the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 36 (3): 282-290.
- Cuzon, G., Cahu C., Aldrin F.J., Messenger L., Stephan G. y Mével M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus*. *Proc. World Maric. Soc.* 11: 410– 423.
- Cuzon, G., Arena L., Goguenheim J., Goyard E. y Aquacop. 2004. Is it possible to raise, offspring of the 25th generation of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and 18th generation *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) in clear water to 40g?. *Aquaculture Research*. 35: 1244-1252.
- Donaldson, M. R., Cooke S. J., Patterson D. A. y Macdonaldk J. S. 2008. Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology*. 73: 1491–1530.
- Ellington, W. R. 1983. The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. *J. Exp. Zool.* 228: 431-444.
- Ellington, W.R., 2001. Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 289-325.
- England, W.R. y Baldwin, J., 1983. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) : role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behaviour. *Physiol. Zool.* 56: 614–622.
- Fernández, I., M. Bastarrechea, M. Oliva y M. Noa. 1995: Variations des lipides totaux, acides gras et sterols chez la crevette blanche *Penaeus schmitti* aux differents stades du cycle de mue. *Rev. Invest. Mar.* 16 (1-3):171-176.
- Gäde, G. 1983. Energy metabolism of arthropods and molluscs during environmental and functional anaerobiosis. *J. Exp. Zool.* 228: 415-429.
- Galindo, C., Gaxiola G., Cuzon G., y Chiappa-Carrara X. 2009. Physiological and biochemical variations during the molt cycle in juvenile *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions. *Journal of Crustacean Biology*. 29 (4): 544-549.
- Guzmán-Sáenz, F. M., González-Alanís, P., Sanchez M., J. G., Gutierrez S., G., Aguirre G. G. y Perez-Castañeda R. 2010. Uso de diferentes fármacos para anestesiarse camarones *Litopenaeus vannamei* Boone en prácticas de acuicultura. *Revista electrónica de Veterinaria*. 11 (03): 1-9.

- Hall, M. R. y 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 (3): 290–299.
- Herreid, C.F. y R.J. Full. 1988. Energetics and locomotion. Biology of the Land Crab (eds. W. W. Burggren y B.R. McMahon). Cambridge University Press. New York. 333-377.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D. y Freminet, A. 1995. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery on the hypogean *Niphargus rhenorrhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea:Amphipoda). Physiol. Zool. 68: 223-244.
- Hsieh, S. L., Ruan Y. H., Li Y. C., Hsieh P. S., Hu C. H. y Kuo C. M. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture. 275 (1–4): 335-341.
- Joseph, A. y Philip R. 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. Aquaculture. 272 (1-4): 87-97.
- Juárez, M. L.: 2008. Current status of shrimp aquaculture in México. Panorama Acuícola Magazine. Ene/feb. 48-53.
- Kuo, C. M. y Yang Y. H. 1999. Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal Comp. Physiol. B. 169: 49-54.
- Laidley, C. W. y Leatherland, F. F. 1988. Circadian studies of plasma cortisol, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology. 33: 73-88.
- Le Coz, J.R. 1989. La charge énergétique adenylique : Mise au point, application a trois mollusques bivalves, synthèse et perspectives. Ed. IFREMER, 104 pp.
- Le Moullac, G. L. y Haffner P. 2000 Enviromental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. 191: 121-131.

- Le Moullac, G., Cheize, M., Gastineau, O., Daniel, J.Y., Le Coz, J.R., Huvet, A., Moal, J., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A. y Samain, J.F. 2008. Ecophysiological and metabolic adaptations to sulphide exposure of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 27: 355-363.
- Lorenzon, S. 2005. Hyperglycemic stress response in Crustacea. *ISJ.* 2, 132-141.
- Lucas, A. 1996. *Bioenergetic of Aquatic Animals*. Taylor y Francis, London. 169 pp.
- Lutterschmidt, W.I. y Hutchinson, V.H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Can. J. Zool.* 75: 1561–1574.
- Magallón P. S. 2004. Evaluación de las moléculas asociadas al sistema inmune, bajo condiciones agudas de hipoxia en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz B.C.S. México.
- Magallón, F. y Villareal H. (Coordinadores). 2007. Desarrollo Sustentable de la Acuicultura en México. Orientaciones estratégicas. CIBNOR/ Comisión de Pesca de la Cámara de Diputados/CEDRSSA. La Paz, B.C.S. México.
- Marazza, D., Bornens, Ph. y Le Gal, Y. 1996. Effect of Ammonia on Survival and Adenylate Energy Charge in the Shrimp *Palaemonetes varians*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 34: 103-108.
- Mendes, R., Quinta R. y Nunes M.L. 2001. Changes in baseline levels of nucleotides during ice storage of fish and crustaceans from the Portuguese coast. *Eur. Food. Res. Technol.* 212: 141–146.
- Mercier, L., Palacios, E., Campa-Cordova, A.I., Tovar-Ramirez, D., Hernández-Herrera, R. y 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-Almazán, A., Civera, R., Quiñones-Arreola, M.F., Wille, M., Sorgeloos, P. y 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.* 40: 1849-1863.

- Moal, J., Samain, J.F., Bodoy, A. y Le Coz, J.R. 1987. Approche de l'état physiologique de l'huitre creuse *Crassostrea gigas* au cours d'un cycle saisonnier a Marennes-Oleron. *Haliotis*. 16 : 497-511
- Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F. y Daniel, J.Y. 1989a. Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high-performance liquid chromatography. *Comp. Biochem Physiol.* 93B: 307-316.
- Moal, J., Samain, J.F., Le Coz, J.R. y Daniel, J.Y. 1989b. Responses and adaptations of adenylate energy charge and digestive enzyme activities to tidal emersion of *Crassostrea gigas* population in Marennes-Oleron Bay. *Scient. Mar.* 53: 699-704.
- Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F., Daniel, J.Y. y Bodoy, A., 1991a. Oyster adenylate energy charge: responses to levels of food. *Aquat. Living Resour.* 4: 133-138.
- Moal, J., Le Coz, J.R., Samain, J.F. y Daniel, Y. 1991b. Adenylate energy charge: a possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 201-205.
- Morón M. Ll. 2006. Hipoxia e inmunidad en el camarón café *farfantepenaeus californiensis* (Pérez- farfante y Kensley, 1997). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz B.C.S. México.
- Morris, S. y Adamczewskab A. M. 2002. Utilisation of glycogen, ATP and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.* 133: 813–825.
- Morris, S., Van Aardt, W.J. y Ahern, M.D. 2005. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia. *Aquat. Toxicol.* 75 : 16-31.
- Mungier, C. y Justou C. 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 309: 3546.

- Mugnier, C., Lemonnier H. y Legrand A. 2006. Physiological response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to short-term confinement on a pond bottom. *Aquaculture*. 253 (1-4): 703-711.
- Mugnier, C., Zipper E., Goarant C. y 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.
- New, M.B., 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture*. 9: 101-144.
- Newland, P.L., Neil, D.M. y Chapman, C.J. 1992. Escape swimming in the Norway lobster. *J. Crustacean Biol.* 12: 342-353.
- Oliveira, G.T., Fernandes, F.A., Bond-Buckup, G., Bueno, A.A. y Silva, R.S.M. 2003. Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). *Mem. Mus. Vic.* 60, 59-62.
- Pascual, C., Gaxiola, G. y Rosas, C. 2003. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar. Biol.* 142: 735-745.
- Pascual C., Sánchez A., Sánchez A., Vargas-Albores F., LeMoullac G. y Rosas C. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture*. 218: 637-650.
- Pascual C., Sánchez A., Zenteno E., Cuzon G., Gabriela G., Brito R., Gelabert R., Hidalgo E. y Rosas C. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 251: 416- 429.
- Perazzolo M. L. Gargioni R. Ogliari P. y Barroco A. M. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214: 19-33.
- Perez-Jar, L., Rodríguez-Ramos, T., Ramos, L., Guerra-Borrego, Y. y Racotta, I.S. 2006. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*. 252: 591-597.
- Pérez-Rostro, C. I., Racotta I. S. y Ibarra A. M. 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 302: 189-200.

- Pickering, A. D. 1981. Introduction: The Concept of Biological Stress. In: Stress and Fish. (Pickering, A. D.) Academic Press. London. 1-9.
- Racotta, I.S. y Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 29: 351-356.
- Racotta, I.S. y Hernández-Herrera, R. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiol. 125A: 437-443.
- Racotta, I.S., Palacios, E. y Méndez, L. 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp *Penaeus vannamei*. Mar. Fresh. Behav. Physiol. 35: 269-275.
- Racotta, I.S., Palacios, E., Hernández-Herrera, R. y Carreño, D. 2003. Metabolic responses of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to environmental and handling stress. Comp. Biochem. Physiol. 134A: S27.
- Racotta, I.S., Mercier, L., Palacios, E., Civera, R., Quiñones-Arreola, M.F., Muhlia-Almazán, A., Yepiz-Plascencia, G., Wille, M. y Sorgeloos, P. 2007. Effect of dietary highly-unsaturated fatty acid levels and stress on immunological indicators of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Europe '07. Istanbul-Turkey pp. 470-471.
- Rodríguez, E. M. Medesani D. A. y Fingerman M. 2006. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 1-11.
- Rosas, C., Cuzon G., Gaxiola G., LePriol Y., Pascual C., Rossignol J., Contreras F., Sánchez A. y Van W. A. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259: 1-22.
- Rosas, C., Pascual, C., López, N. y Sánchez, A. 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. 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. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

- Rosas, C., Cooper E. L., Pascual C., Brito R., Gelabert R., Moreno T., Miranda G. y Sánchez A. 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Marine Biology*. 145: 401–413.
- Ross, L. G. y Ross, B. 1999. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Institute of Aquaculture. University of Stirling. Second Edition. Blackwell Science. Great Britain. 218 pp.
- Ross, L. G., Sánchez, J. B., Martínez Palacios C. A., Racotta, I. S. y Toledo-Cuevas, M. 2007. Anaesthesia, sedation and transportation of juvenile *Menidia estor* (Jordan) using benzocaine and hypothermia. *Aquaculture Research*. 38: 909-917.
- Santos, E.A. y Keller R. 1993. Regulation of circulating levels of the hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. *J. Comp. Physiol. B*. 163: 374-379.
- Sainz-Hernández, J.C., Racotta, I.S., Dumas, S. y Hernandez-Lopez, J. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in *Litopenaeus vannamei* male and female on several metabolic and immunologic variables. *Aquaculture*. 283: 188-193.
- Salin, K. R. y Jayasree-Vadhyar K. 2001. Effect of different chilling rates for cold anaesthetization of *Penaeus monodon* (Fabricius) on the survival, duration and sensory quality under live storage in chilled sawdust. *Aquaculture Research*. 32 (2): 145–155.
- Salin, K.R., 2005. Live transportation of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) in chilled sawdust. *Aquaculture Research*. 36 (3): 300–310.
- Sánchez, A., Pascual C., Sánchez A., Vargas-Albores F., Le Moullac G. y Rosas C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation *Aquaculture*. 198: 13–28.
- Sánchez-Paz, A., Carreño, F.L., Almazán, A., Uriarte, A.B., López, J.Y. y Plascencia, G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 241–249.
- Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Hernández-López J., Muhlia-Almazán A. y Yepiz-Plascencia G. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 340, 184–193.

- Sánchez-Paz, A., Soñanez-Organis, J.G., Peregrino-Uriarte, A.B., Muhlia-Almazan, A. y Yepiz-Plascencia, G. 2008. Response of the phosphofructokinase and pyruvate kinase genes expressed in the midgut gland of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* during short-term starvation. *J. Exp. Mar. Biol.* 362: 79-89.
- Santos, E.A., Keller R., Rodríguez E. y López L. 2001. Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 34: 75-80.
- Saydmohammed, M. y Kumar-Pal A. 2009. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture.* 298: 162–167.
- Shu-Ling, H., Yuan-Hwa R., Yi-Chen L., Pei-Shan H., Chin-Hwa H. y Ching-Ming K. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture.* 275: 335–341.
- Silva-Castiglioni, D., Kaiser D. B., Fernandes F. A., Buckup L. y Oliveira G. T. 2011. Adaptações metabólicas dos crustáceos ao déficit de oxigênio ambiental. *Brazilian Journal of Biosciences* . 10 (1): 114-123.
- Soltani, M., Marmari GH. y Mehrabi M. R. 2004. Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality Conditions. *Aquaculture International.* 12: 457-466.
- Soñanez-Organis, J.G., Peregrino-Uriarte A. B., Gómez-Jiménez S., López-Zavala A., Jay F. H. y Yepiz-Plascencia G. 2009. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology.* 150 (3): 395-405.
- Stuck, K.C., Watts, S.A. y Wang, S.Y. 1996. Biochemical responses during starvation and subsequent recovery in postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.* 125: 33–45.
- Teshima, S.I., Kanazawa, A. y Okamoto, H. 1977. Variation in lipid classes during the molting cycle of the prawn *Penaeus japonicus*. *Mar. Biol.* 39: 129-136.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11: 256-265.
- Viant, M. R., Rosenblum E. S. y Tjeerdema R. S. 2001. Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B.* 765: 107–111.

- Wang, W.N., Wang, A.L., Chen, L., Liu, Y. y Sun, R.Y. 2002. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles. *Aquat. Toxicol.* 60: 75-83.
- Wang, W.N., Wang, A.L., Liu, Y., Xiu, J., Liu, Z.B. y Sun, R.Y. 2006. Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture.* 256: 624-630.
- Wedemeyer, G. A. y Yasutake, W. T. 1977. Clinical methods for the assessment of the effects to environmental stress on fish health. *Technical Papers of the U.S. Fish and Wildlife Service.* 289: 18.
- Wedemeyer, G. A. y Mcleay, D. J. 1981. Methods for Determining the Tolerante of Fishes to Environmental Stressors. In *Stress and Fish* (Pickering, A. D.) Academic Press. London. 247-276.
- Wedemeyer, G. A., Barton, B. A. y McLeay, D. J. 1990. Stress and acclimation. In: Schreck: C. B. and Moyle, P. B. (eds) *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society. Bethesda. Maryland. 451-489.
- Wendelaar-Bonga, S. E. 1997. The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews.* 77 (3): 591-625.
- Waterstrat, P.R. y Pinkham L. 2005. Evaluation of Eugenol as an Anesthetic for the American Lobster *Homerus americanus*. *Journal of the world aquaculture society.* 36 (3): 420-424.
- Yu, X., Zhang X., Zhang P. y Yu C. 2009. Critical swimming speed, tail-flip speed and physiological response to exercise fatigue in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicas*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.* 153: 120-124.