



Programa de Estudios de Posgrado

“Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los
mecanismos de osmorregulación del camarón blanco
Litopenaeus vannamei (Boone) expuestos a estrés hipo e
hipersalino a corto y largo plazo”

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

p r e s e n t a

Miguel Ángel Hurtado Oliva

La Paz, B. C. S., (Abril de 2004)

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 19 del Mes de abril del 2004, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo"

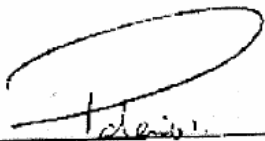
Presentada por el alumno:

Miguel Ángel Hurtado Oliva

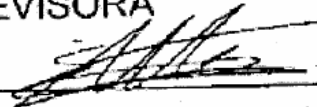
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuacultura

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

LA COMISION REVISORA



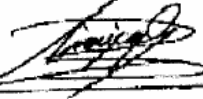
Elena Palacios Mechetnov
DIRECTORA DE TESIS



Ilie Racotta Dimitrov
CO-TUTOR



Roberto Civera Carecedo
CO-TUTOR



Mónica Hernández Rodríguez
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

La tolerancia y supervivencia de los camarones a las variaciones de salinidad están estrechamente relacionadas con los mecanismos de osmorregulación. Diversos trabajos en peces y mamíferos, describen la importancia de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en la permeabilidad de las membranas y otros procesos relacionados con la osmorregulación. Por lo anterior, en la presente tesis se evaluó la posibilidad de modular la respuesta osmorreguladora a corto y largo plazo, a través de la suplementación de alimento peletizado con dos diferentes niveles de HUFA (0 y 50%), en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. En el primer experimento (exposición aguda), los camarones (3.5 ± 0.5 g) se cultivaron a 30 ups por tres semanas, durante las cuales se alimentaron con los alimentos mencionados, y al cabo de ese tiempo, se sometieron a tres salinidades: 5, 30 (control) y 50 ups con un lapso de aclimatación de 15 horas. En el segundo experimento (exposición crónica), los organismos fueron aclimatados a las mismas salinidades descritas con anterioridad y desde el principio, alimentados durante tres semanas como en el primer experimento. En ambos experimentos se registraron altos porcentajes de supervivencia (>70%), pero en el segundo experimento la supervivencia fue menor en organismos cultivados a 5 ups. Sin embargo, el menor crecimiento en ese mismo experimento fue en los organismos expuestos a 50 ups. El enriquecimiento del alimento con HUFA no influyó significativamente en la supervivencia de los juveniles de camarón en ninguno de los dos experimentos. La presión osmótica en hemolinfa varió en relación directa con la salinidad, sin embargo, los organismos que fueron expuestos a estrés hiposmótico lograron mantener su presión osmótica interna aproximadamente tres veces mayor a la del medio, mientras que los que fueron expuestos a estrés hiperosmótico

mantuvieron su presión osmótica interna aproximadamente a la mitad en relación a la del medio, lo cual demuestra la capacidad de osmorregulación de juveniles de esta especie. En el segundo experimento, el porcentaje de humedad en los músculos de los organismos cultivados a 5 ups fue menor, mientras que la exposición aguda del primer experimento, las diferencias no fueron significativas. En branquias, la humedad fue menor en los organismos cultivados a 50 ups del segundo experimento, mientras que en el primer experimento, la humedad fue mayor con la exposición aguda a 5 ups. De manera general, estos resultados concuerdan con una deshidratación a altas salinidades y una ganancia de agua a bajas salinidades. La actividad total de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ en branquias anteriores fue significativamente mayor en organismos cultivados a 5 ups del segundo experimento. No se encontraron diferencias significativas en la actividad total ni específica en relación a la alimentación, a pesar de que la composición de ácidos grasos en las membranas de las branquias fue significativamente diferente entre los organismos alimentados con 0 y 50% PUFA. Aparentemente, los mecanismos de activación de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ no son determinantes para la osmorregulación en juveniles de camarón, como lo son para las postlarvas y en este trabajo sólo se le pudo atribuir cierta importancia en condiciones de estrés crónico hiposmótico.

Palabras clave: $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, salinidad, crustáceos, HUFA, branquias, estrés agudo, estrés crónico, aclimatación.

ABSTRACT

The ability of shrimp to cope and survive during natural salinity fluctuations is associated with osmoregulatory mechanisms. Highly polyunsaturated fatty acids (HUFA) have an important effect on these mechanisms, by changing cellular membrane permeability and affecting activity of proteins associated to the membrane, as has been demonstrated for mammals and teleost fishes. In this work we explore the possibility of modulating the osmoregulatory responses in juveniles of white Pacific shrimp, *Litopenaeus vannamei*, throughout the supplementation of pellets enriched with two different proportions of HUFA (0 and 50%). In an acute exposure experiment, shrimp (3.5 ± 0.5 g) were grown at 30 psu, fed enriched pellets, and after three weeks were acclimated to 5, 30 (control), and 50 psu during 15 hours. In a second experiment (chronic exposure), shrimp were acclimated to different salinities from the beginning, and fed the enriched pellets described before for three weeks. In both experiments survival was high (>70%), but shrimp exposed to a chronic salinity of 5 psu had lower survival. However, the lowest growth rate was found for shrimp exposed to 50 psu. Survival was not significantly affected by using HUFA-enriched pellets in either experiment. Osmotic pressure in hemolymph changed significantly in relation to hypo- and hyperosmotic stress: shrimp exposed to 5 psu in the chronic experiment maintained an osmotic pressure three-fold higher than the environmental salinity, whereas osmotic pressure in shrimp exposed to 50 psu was half of the medium. These results confirm the osmoregulatory ability of juveniles of this specie. The content of water (% moisture) in muscle was significantly lower in organism exposed chronically to 5 psu, but no significant differences were observed in shrimp exposed to acute changes in salinity. Water content in gills was significantly less in shrimp exposed chronically to 50 psu, but moisture content in gills in the acute exposure was higher at 5 psu,

in agreement with dehydration observed in tissues under hyperosmotic stress and a gain of water in organisms exposed to hyposmotic conditions. The activity of Na⁺-K⁺-ATPase in anterior gills was significantly higher in shrimp exposed to chronic hyposmotic conditions. No significant differences were observed in total and specific activity of Na⁺-K⁺-ATPase in relation to enrichment with PUFA, although the composition of fatty acids in the cell membrane of gills was significantly different between organisms fed enriched 0 and 50% PUFA pellets. Apparently, the activation of Na⁺-K⁺-ATPase is not essential for osmoregulation in juveniles, as is the case for postlarvae of the same species.

Keywords: Na⁺-K⁺-ATPase, salinity, crustacean, HUFA, gills, acute stress, chronic stress, acclimatization.

DEDICATORIA

A mis **PADRES, MIGUEL y YOLANDA**, su motivación y cariño fueron determinantes para continuar en todo momento. **GRACIAS POR DARME SU APOYO SIEMPRE.**

A mi hermano **GABRIEL**, mi fuerza es tu tenacidad.

A mis abuelos **FRANCISCO y PETRA** (q.e.p.d), sus huellas siguen dejando rastro.

MARLENNE, gracias por tu compañía, he aprendido mucho de ti, esta tesis te la dedico con mucho cariño, sin tu apoyo este éxito no sería rotundo.

DIANA GÓNGORA, gracias por entrarle a la acuicultura, no se me olvida que me ayudaste en alguna ocasión en la rutina de mantenimiento.

A **OLIVIA ARJONA**, porque el esfuerzo ha dado frutos y los quiero compartir contigo. Gracias por tu amistad.

A mis amigos viejos amigos: **JAVIER, CLAUDIA, RICARDO, RAÚL, GEORGINA y EVELYN**; así como a mis compañeros de maestría y amigos de estos últimos años: **ARTURO, GLORIA, LAURA CELIS, AZUCENA, VOLKER, KARINA, FRANCISCO MADRIÑAN, MANUEL LOBATO, SCARRY, RAFA, PONCHO, PALOMA, LAURA RIVERA y HERVEY.**

A esta generación de maestría tan particular, los **CIBbrothers**, muchas son las cosas que nos hacen diferentes y en las diferencias encontramos la amistad.

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos que financiaron el desarrollo y conclusión de esta tesis: “Osmoregulatory mechanisms in larvae of white Pacific shrimp, *Penaeus vannamei*, in relation to salinity challenges” (IFS A/32209-1), “Papel de los lípidos en los mecanismos de osmorregulación del camarón *Litopenaeus vannamei*” SEP-CONACYT 40814-Q, y el proyecto de recursos propios “Mejoramiento genético del camarón blanco” (975-0).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca **no. 166359**.

A la Dirección de Posgrado a cargo de la **DRA. THELMA R. CASTELLANOS C.** por las facilidades otorgadas para la conclusión de este trabajo. Y muy especialmente a **OSVELIA IBARRA, LETICIA GONZÁLEZ, BEATRIZ GÁLVEZ y GUADALUPE SÁNCHEZ**, parte fundamental del buen funcionamiento de este departamento, por sus atenciones, Muchas Gracias.

A MI DIRECTORA LA **DRA. ELENA PALACIOS**, por motivarme en todo momento a pensar y enseñarme a discernir ideas, gracias por darme la oportunidad de trabajar y aprender, esta tesis fue un gran reto que incrementa el valor de este trabajo, aprecio sus comentarios y sugerencias. Gracias por su esfuerzo y dedicación.

A MIS ASESORES, **DR. ILIE RACOTTA** y **DR. ROBERTO CIVERA**, por su esfuerzo, dedicación y sugerencias para hacer de éste un excelente trabajo. También quiero agradecerles todos sus comentarios, en que me formaron como profesionista y sobre todo por aquellos que me hicieron mejor persona.

A mi asesora, la **DRA. MÓNICA HERNÁNDEZ (CICESE)** por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo, y particularmente quiero darle las gracias por facilitarme el osmómetro.

Quiero agradecer especialmente a **JOSÉ LUÍS RAMÍREZ, J. MANUEL MACKLIZ, GABRIEL GONZÁLEZ, ERNESTO y BASILIO** por su apoyo en la parte experimental y cultivo de los camarones. Así como a todas aquellas personas que me apoyaron en el muestreo, preparación y análisis de muestras: **OLIVIA ARJONA, DULCE LUNA, ALMA ALVAREZ, ANGÉLICA PÉREZ y BENJAMÍN APARICIO**. *NO SE ME OLVIDA SU EXTRAORDINARIO APOYO, ESTA TESIS ES UN LOGRO DE USTEDES TAMBIÉN.*

A todos los técnicos de cada uno de los múltiples laboratorios del **CIBNOR** en que me permitieron hacer parte de mi tesis: **ERNESTO GOYTORTUA, JOSÉ LUÍS RAMÍREZ, SUSANA ÁVILA, OLIVIA ARJONA, ROBERTO HERNÁNDEZ, DIANA CARREÑO, IBÁN MURILLO, LAURA CARREÓN, BAUDILIO ACOSTA, LILIA IBARRA, SONIA ROCHA, DOLORES RONDERO y CARMEN RODRIGUEZ**.

El funcionamiento de **POSGRADO** y en particular del **LABORATORIO DE COMPUTO** es una labor extenuante, y sin el **APOYO** absoluto de **HORACIO SANDOVAL** y **MANUEL MELERO**, lo sería aún más; **POR ESO QUIERO AGRADECERLES SU ASESORÍA TÉCNICA, Y SOBRE TODO SU AMISTAD**.

Al **CIBNOR** por todas las facilidades para realizar mis estudios de **POSGRADO** y la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	
Abstract	
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
a. Mecanismos de osmorregulación: Na ⁺ -K ⁺ -ATPasa	"
b. Ácidos grasos y permeabilidad de membranas celulares	8
c. Aminoácidos libres	9
III. Justificación	11
IV. Hipótesis	12
V. Objetivos	13
Objetivo general	"
Objetivos particulares	"
VII. Material y Métodos	14
1. Cultivo y aclimatación de juveniles a las condiciones de laboratorio	"
2. Alimentos experimentales	"
A. PRIMER ESTUDIO (EXPOSICIÓN A ESTRÉS AGUDO):	17
Papel de los PUFA en los mecanismos de osmorregulación ante estrés hipo- e hiper-osmótico y su efecto a corto plazo	
B. SEGUNDO ESTUDIO (EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO):	20
Papel de los PUFA en los mecanismos de osmorregulación ante estrés hipo- e hiper-osmótico y su efecto a largo plazo	
1. ANÁLISIS EN HEMOLINFA	21
1.1 Presión osmótica	"
1.2 Análisis bioquímicos	"
1.2.1 Glucosa	"
1.2.2 Lactato	22
1.2.3 Proteínas totales	23
1.2.4 Hemocianina	"

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

2. ANÁLISIS EN TEJIDO MUSCULAR Y HEPATOPÁNCREAS	24
2.1 Proteínas	"
2.2 Carbohidratos	25
2.3 Carotenoides	"
2.4 Triglicéridos	26
2.5 Ácidos grasos	"
a) Separación de lípidos	27
b) Derivatización	"
3. ANÁLISIS EN BRANQUIAS	"
3.1 Actividad enzimática	"
3.2 Proteínas	28
3.3 Ácidos grasos	"
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
VII. Resultados	30
1. PRIMER ESTUDIO (<i>Exposición a estrés agudo</i>)	"
1.1 Temperatura y oxígeno	"
1.2 Crecimiento, supervivencia y factor de conversión alimenticio	31
1.3 Análisis bioquímicos	32
1.3.1 Hemolinfa	"
1.3.2 Músculo	33
1.3.3 Hepatopáncreas	34
1.3.4 Branquias	35
1.4 Composición de ácidos grasos en hepatopáncreas y branquias	36
1.4.1 Hepatopáncreas: Fracción neutra	37
1.4.2 Hepatopáncreas: Fracción polar	40
1.4.3 Branquias: Fracción neutra	43
1.4.4 Branquias: Fracción polar	46
2. SEGUNDO ESTUDIO (<i>Exposición a estrés crónico</i>)	50
2.1 Temperatura y oxígeno	"

2.2 Crecimiento, supervivencia y factor de consumo aparente	51
2.3 Análisis bioquímicos	53
2.3.1 Hemolinfa	"
2.3.2 Músculo	54
2.3.3 Hepatopáncreas	55
2.3.4 Branquias	57
2.4 Composición de ácidos grasos en branquias y hepatopáncreas	59
2.4.1 Hepatopáncreas: Fracción neutra	"
2.4.2 Hepatopáncreas: Fracción polar	62
2.4.3 Branquias: Fracción neutra	65
2.4.4 Branquias: Fracción polar	68
VIII. Discusión	71
A. EFECTO DEL ALIMENTO	"
Supervivencia, crecimiento y factor de consumo alimenticio (FCA)	"
Respuesta al estrés: Lactato y glucosa	74
Capacidad osmorregulatoria: Presión osmótica	76
Composición de ácidos grasos y actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$	"
B. EFECTO DE LA SALINIDAD	78
Supervivencia, crecimiento y factor de consumo aparente (FCA)	"
Respuesta al estrés: Lactato y glucosa	85
Capacidad osmorregulatoria: Presión osmótica	86
Capacidad osmorregulatoria: Actividad $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$	91
IX. Conclusiones	103
X. Referencias	105
XI. Anexos	116
Anexo A: Fabricación del alimento	
Anexo B: Presión osmótica	
Anexo C: Técnica de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$	
Anexo D: Análisis de ácidos grasos	
Anexo E: Frecuencia de mudas	
Anexo F: Tablas de ácidos grasos	

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ubicación de la Na ⁺ -K ⁺ ATPasa en las células clorhídricas de la membrana branquial de peces teleósteos y su participación en los mecanismos de osmorregulación. Células secretoras tipo α (lado izquierdo) y captadoras tipo β (lado derecho).	5
Figura 2	Intercambio iónico y activación de la anhidrasa carbónica.	6
Figura 3	Temperatura (°C) del agua en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés agudo	30
Figura 4	Concentración del oxígeno (mg/mL) en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés agudo	31
Figura 5	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	37
Figura 6	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	38
Figura 7	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	39
Figura 8	Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	40
Figura 9	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	40
Figura 10	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	41

Figura 11	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	42
Figura 12	Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino agudo.	43
Figura 13	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	44
Figura 14	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	44
Figura 15	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	45
Figura 16	Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	46
Figura 17	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	47
Figura 18	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	47
Figura 19	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	48
Figura 20	Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino agudo.	49
Figura 21	Temperatura (°C) del agua en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés crónico.	50
Figura 22	Concentración del oxígeno (mg/mL) en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés crónico.	50
Figura 23	Crecimiento en peso (%) de los juveniles de camarón expuestos a estrés salino crónico (5, 30 y 50 ups) y alimentados con dos alimentos enriquecidos con PUFA (0 y 50 %).	51

Figura 24	Supervivencia (%) de los juveniles de camarón expuestos a estrés salino crónico (5, 30 y 50 ups) y alimentados con dos alimentos enriquecidos con PUFA (0 y 50 %).	52
Figura 25	Factor de conversión alimenticio (FCA) de los juveniles de camarón expuestos a estrés salino crónico (5, 30 y 50 ups) y alimentados con dos alimentos enriquecidos con PUFA (0 y 50 %).	53
Figura 26	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino crónico.	59
Figura 27	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino crónico.	60
Figura 28	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino crónico.	61
Figura 29	Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino crónico.	62
Figura 30	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a un estrés salino crónico.	62
Figura 31	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino crónico.	63
Figura 32	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino crónico.	64
Figura 33	Índice de saturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas de organismos expuestos a estrés salino crónico.	65
Figura 34	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	65

Figura 35	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	66
Figura 36	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	67
Figura 37	Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	67
Figura 38	Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	68
Figura 39	Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	69
Figura 40	Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	69
Figura 41	Índice de saturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en branquias de organismos expuestos a estrés salino crónico.	70
Figura 42	Frecuencia de mudas de los organismos de los experimentos crónico y agudo.	127
Figura 43	Frecuencia de mudas de los organismos del experimento de estrés crónico cultivados a 5, 30 y 50 ups.	127

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla I	Adaptaciones a corto y largo plazo a diferentes salinidades en las células clorhídricas de las branquias de peces (Sakamoto <i>et al.</i> , 2001).	7
Tabla II	Composición de los alimentos experimentales (g/100 g de alimento).	15
Tabla III	Composición química proximal de los alimentos experimentales (0 y 50% PUFA)	16
Tabla IV	Proporción de ácidos grasos (%) de la fracción neutra (LN) y polar (LP) de los alimentos peletizados con las emulsiones de 0 y 50% PUFA.	16
Tabla V	Mortalidad (%) durante estrés agudo: estudio preliminar.	18
Tabla VI	Presión osmótica y análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en la hemolinfa de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	33
Tabla VII	Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en músculo de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	33
Tabla VIII	Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en hepatopáncreas de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	34
Tabla IX	Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en branquias anteriores (a) y posteriores (p) de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	36

Tabla X	Presión osmótica y análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en hemolinfa de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	55
Tabla XI	Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en músculo de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	56
Tabla XII	Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en hepatopáncreas de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	58
Tabla XIII	Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en branquias anteriores (a) y posteriores (p) de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	60
Tabla XIV	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con una alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	129
Tabla XV	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	130
Tabla XVI	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	131
Tabla XVII	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	132
Tabla XVIII	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	133

Tabla XIX	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	134
Tabla XX	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	135
Tabla XXI	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.	136
Tabla XXII	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	137
Tabla XXIII	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	138
Tabla XXIV	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	139
Tabla XXV	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	140
Tabla XXVI	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	141

Tabla XXVII	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	142
Tabla XXVIII	Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	143
Tabla XXIX	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.	144
Tabla XXX	Composición de premezcla de vitaminas.	119
Tabla XXXI	Composición de premezcla de minerales.	119

I. INTRODUCCIÓN.

La pesquería del camarón a nivel mundial se ha mantenido constante durante las últimas décadas, lo cual sugiere que la actividad se encuentra en su capacidad máxima de explotación sustentable (López-Martínez *et al.*, 2000). La sobreexplotación de los recursos naturales provoca que el tamaño de las poblaciones y la talla de captura disminuyan y, por lo tanto, el costo aumente. Como consecuencia de esta escasez, la producción proveniente de las técnicas de cultivo se ha incrementado a nivel internacional, nacional y regional (SEPESCA, 1990). La producción mundial de camarón por acuicultura para el año 2001 fue de 1,087,111 toneladas métricas con un valor de USD \$ 6,880,068,900. El camarón de cultivo representó el 26% de la producción total para el año 2000 (FAO, 2002). En este mismo año en México, la producción de camarón por acuicultura fue de 31,362.8 toneladas métricas, aproximadamente el 30% de la producción total de camarón, de las cuales la principal especie cultivada fue el camarón blanco del Pacífico (Escutia, 2001).

El camarón blanco del Pacífico, *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), actualmente conocido como *Litopenaeus vannamei* (Pérez-Farfante y Kensley, 1997), es un camarón peneido nativo de la costa del Pacífico que se distribuye desde Sonora en el Golfo de California hasta Perú. Como adulto habita en zonas bentónicas costeras hasta profundidades de 72 m, donde se reproduce (Martínez-Córdova, 1999). En estadio de postlarva (PL) migra de hábitos planctónicos marinos a estuarinos, donde termina la transformación de postlarva hasta alcanzar la etapa de juvenil. Los ambientes estuarinos están sujetos a grandes variaciones de salinidad, temperatura y oxígeno disuelto (Dall, 1981, Bouaricha *et al.*, 1991), estas variables fisicoquímicas influyen en la supervivencia de postlarvas (PL) y juveniles de camarón al incidir en su capacidad de adaptación a la variabilidad de estas zonas costeras.

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

Bajo condiciones de cultivo estos organismos también enfrentan fuertes variaciones de salinidad y temperatura, y sólo aquellos que toleran dichos cambios pueden sobrevivir y crecer (McGraw *et al.*, 2002). La tolerancia y la supervivencia del camarón a las variaciones de salinidad dependen entre otras cosas, de su capacidad de osmorregulación la cual les permite mantener su concentración interna de manera independiente a la del medio externo.

II. ANTECEDENTES

a) Mecanismos de osmorregulación: $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa

En los organismos acuáticos, la capacidad de osmorregulación se puede definir como la diferencia existente en el gradiente osmótico entre la hemolinfa y el medio externo (Charmantier *et al.*, 1988; Bouaricha *et al.*, 1991; Brown y Terwilliger, 1992; Péqueux, 1995; Charmantier, 1998). La capacidad de osmorregulación aparece en los camarones peneidos en el estadio de zoea y llega a su máximo en el estadio de PL5 (postlarvas en estadio cinco, de aproximadamente diez días de edad) (Thuet *et al.*, 1988; Bouaricha *et al.*, 1991; Brown y Terwilliger, 1992; Anger y Charmantier, 2000). La capacidad osmorreguladora depende de distintos mecanismos, entre ellos y de los más importantes es la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ localizada en la membrana basolateral de las branquias, tanto de peces (Evans *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 2001) como de crustáceos (Siebers *et al.*, 1985; Dickson *et al.*, 1991; Bouaricha *et al.*, 1991; Sommer y Mantel, 1991), la cual se encuentra acoplada a una ATPasa (EC 3.6.1.37) que la provee de energía. El incremento en la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa es un proceso de adaptación esencial durante el ciclo de vida del camarón. Esta capacidad de los organismos se incrementa con el desarrollo larvario y especialmente al desarrollarse el epitelio branquial, principal estructura encargada de dichos procesos. En crustáceos con capacidad osmorreguladora, el transporte de iones se realiza a nivel de branquias posteriores y la respiración en las anteriores (Siebers *et al.*, 1985; Thuet *et al.*, 1988; Dickson *et al.*, 1991; Chausson y Regnault, 1995). En este sentido, el epitelio branquial además de tener una función en el intercambio gaseoso, es fundamental para los procesos de osmorregulación y en el balance de pH del organismo (Henry, 2001; Crockett, 1999).

Los mecanismos de osmorregulación en peces teleósteos eurihalinos y los procesos de aclimatación tanto a bajas como altas salinidades han sido revisados y documentados por varios autores (Evans *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 2001; McCormick, 2001; Manzon, 2002). Se ha demostrado que los peces marinos tienden a perder agua fácilmente a través de su superficie corporal, principalmente de las branquias. Para compensar esta pérdida de agua los organismos marinos ingieren cantidades importantes de agua que es absorbida en conjunto con los iones disueltos en ella a través del intestino. El exceso de Na^+ y Cl^- son excretados a través de las branquias y en particular por la actividad de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$, permitiendo mantenerse hiposmóticos con respecto al medio marino. En contraste, los peces dulceacuícolas tienen que eliminar el agua que entra continua y pasivamente a través de su cuerpo. Estos peces, a diferencia de los marinos, producen grandes cantidades de orina hipotónica y no beben agua. La pérdida pasiva de iones en la orina es compensada por el transporte activo a través de las branquias, en las cuales participa la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$. En conclusión, los peces teleósteos que viven tanto en medios hipotónicos como hipertónicos el intercambio iónico se lleva a cabo principalmente en el epitelio de las branquias (Fig.1).

En crustáceos ocurre un proceso similar cuando estos son transferidos a un medio diluido, generando un eflujo de Na^+ y un influjo de agua desde el medio. Para mantener los niveles iónicos adecuados en el interior del organismo, en las branquias se activa la bomba de Na^+-K^+ que intercambia el Na^+ presente en el interior de las branquias por K^+ del plasma. La transferencia de Na^+ desde el exterior hacia el interior de las branquias se lleva a cabo por medio de un mecanismo de intercambio de iones Na^+ por iones H^+ localizado en la membrana apical de las branquias (Siebers *et al.*, 1985; Sommer y Mantel, 1991; Chausson y Regnault, 1995). La anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1) (Fig.2) tiene la función principal de hidratar el dióxido de carbono (CO_2) para su transporte en sangre, esto genera iones bicarbonato (HCO_3^-)

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

y protones (H^+) (Henry y Cameron, 1983; Thuet *et al.*, 1988; Henry, 1996; Henry, 2001). Los protones generados en esta reacción, crean un gradiente que a su vez promueve la entrada de Na^+ desde el exterior hacia adentro de las branquias (Berlind y Kamemoto, 1977; Sommer y Mantel, 1991), mientras que los iones bicarbonato son intercambiados por iones Cl^- en la membrana apical del tejido branquial (McCormick, 2001).

La actividad de la Na^+-K^+ ATPasa varía en función de la salinidad a la cual se aclimatan los crustáceos, siendo menor en aquellos aclimatados a 30 ups y mayor a 10 ups (Siebers *et al.*, 1985, Lucu y Towle, 2003). Por otro lado, la actividad y síntesis de estas dos enzimas se incrementa conforme la larva se desarrolla, y como consecuencia puede aumentar su capacidad osmorreguladora (Thuet *et al.*, 1988; Charmantier *et al.*, 1994; Charmantier *et al.*, 1988; Charmantier y Charmantier-Daures, 1991).

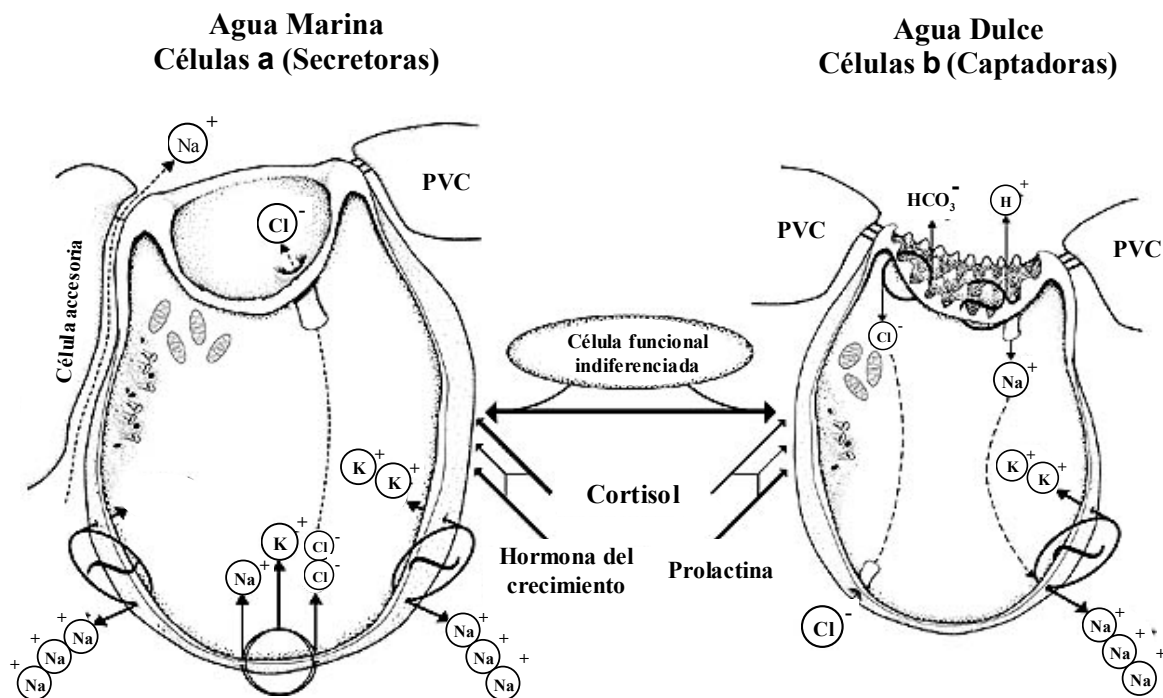


Fig.1 Ubicación de la Na^+-K^+ ATPasa en las células clorhídricas de la membrana branquial de peces teleosteos y su participación en los mecanismos de osmorregulación. Células secretoras tipo α (lado izquierdo) y captadoras tipo β (lado derecho). Tomado de McCormick, 2001.

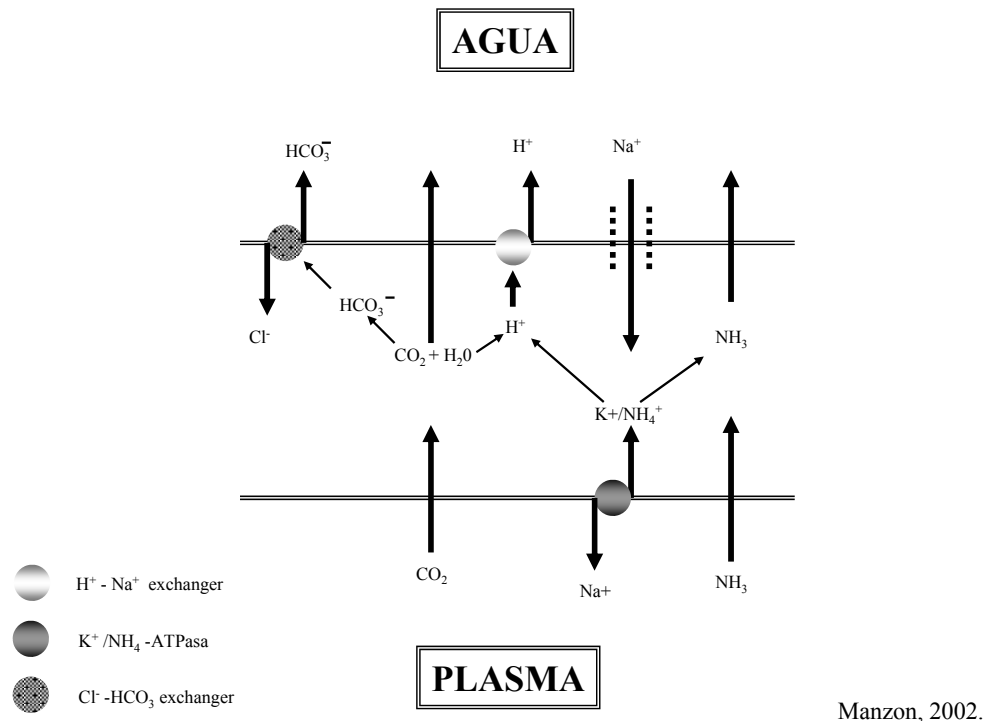


Fig.2 Intercambio iónico y activación de la anhidrasa carbónica.

Los principales eventos relacionados ante un estrés agudo (minutos-horas) y los efectos durante la aclimatación (días-semanas) de los peces teleósteos, tanto a bajas como altas salinidades, son descritas brevemente en la Tabla I. En ella se muestran los dos tipos de células del cloro o clorhídricas (α y β) que se pueden encontrar en función de la salinidad, los principales iones que participan en el balance iónico y los intercambios acoplados entre ellos, así como la importancia de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa.

Tabla I. Adaptaciones a corto y largo plazo a diferentes salinidades en las células clorhídricas de las branquias de peces (Sakamoto *et al.*, 2001).

Adaptación a altas salinidades

Tiempo	Eventos relacionados	Células clorhídricas
Minutos/horas	Osmolaridad externa y $[Ca^{2+}] \uparrow$ Osmolaridad plasmática \uparrow	Canales apicales abiertos $Na^{+}-K^{+}-ATPasa \uparrow$ Eliminación de Na^{+} y $Cl^{-} \uparrow$
Días/semanas	Osmolaridad plasmática \searrow	$Na^{+}-K^{+}-2Cl^{-}$ contratransportador y canales iónicos intercelulares \uparrow Síntesis de células tipo α (secretoras) \uparrow Disminución de células tipo β (captadoras) \downarrow

Adaptación a bajas salinidades

Minutos/horas	Osmolaridad externa y $[Ca^{2+}] \downarrow$ Osmolaridad plasmática \downarrow	Canales apicales cerrados Captación de Na^{+} y $Cl^{-} \uparrow$ $Na^{+}-K^{+}-ATPasa \uparrow$
Días/semanas	Osmolaridad plasmática \nearrow	Captación de Na^{+} y Cl^{-} Disminución de células tipo α (secretoras) \downarrow Síntesis de células tipo β (captadoras) \uparrow

Aumento (\uparrow), disminución (\downarrow) y restablecimiento parcial o total (\nearrow ó \searrow).

En crustáceos, la actividad de la $Na^{+}-K^{+}$ ATPasa se puede incrementar a corto plazo (i.e. minutos-horas) como respuesta a la estimulación hormonal por dopamina, mientras que a largo plazo (i.e. días-semanas) hay una mayor síntesis de proteína (ATPasa) como consecuencia de los cambios de salinidad (Lignot *et al.*, 2000). A corto plazo hay una activación local de la $Na^{+}-K^{+}$ ATPasa y ocurren cambios en la permeabilidad de las membranas branquiales (Mantel, 1985; Thuet *et al.*, 1988; Sommer y Mantel, 1991; Fingerman *et al.*, 1994). A largo plazo se incrementa la síntesis de estas enzimas y posiblemente el número de células especializadas en el transporte de iones en las branquias. Este mecanismo está regulado por hormonas secretadas en el complejo glándula-sinusal/órgano X (Berlind y Kamemoto, 1977; Mantel, 1985; Nan *et al.*, 1993; Charmantier-Daures *et al.*, 1994; Eckhard *et al.*, 1995; Kiron y Diwan, 2000).

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

b) Ácidos grasos y permeabilidad de membranas celulares.

Otro mecanismo que afecta la capacidad de osmorregulación en crustáceos y peces es la permeabilidad de las membranas celulares, principalmente a iones (Whitney, 1974; Leray *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 1982). La permeabilidad al agua esta dada por vía intercelular, por poros membranales en la bicapa lipídica o directamente a través de la bicapa lipídica (Morris *et al.*, 1982). La exposición de crustáceos en medios hiposmóticos o de baja salinidad, disminuye la permeabilidad a los iones, la cual puede ser modulada por la composición de ácidos grasos de la membrana branquial. En anfipodos expuestos a medios diluidos o de baja salinidad, se ha descrito un incremento en la síntesis de ácidos grasos saturados en branquias, con la consiguiente reducción de la fluidez de la membrana branquial y el influjo de agua hacia la hemolinfa al (Morris *et al.*, 1982). En cambio, algunos autores han observado un incremento de ácidos grasos poliinsaturados en peces (Leray *et al.*, 1984), rotíferos (Frolov *et al.*, 1991) y algas (Lee *et al.*, 1989) al ser transferidos a medios de mayor salinidad.

Los ácidos grasos, además de su papel en la fluidez de la membrana, pueden modular directamente la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa. Tal es el caso en *Artemia sp.*, donde se observó la inactivación de esta enzima con altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA por sus siglas en inglés) (Morohashi *et al.*, 1991). Por el contrario, en tejidos de mamífero se ha reportado que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa es inhibida por ácidos grasos saturados, mientras que es estimulada por PUFA (Kimelberg y Papahadjopoulos, 1972; Poon *et al.*, 1981). En células nerviosas y eritrocitos de rata, se demostró que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa está correlacionada con la composición de ácidos grasos de la membrana en que la enzima se encuentra inmersa y que dicha composición puede ser modificada a través de la dieta (Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002). De forma similar se

demonstró que la actividad enzimática de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa y la composición de ácidos grasos de tejido renal y cerebro están estrechamente correlacionadas, encontrando diferencias entre distintos vertebrados (Wu *et al.*, 2001). Sin embargo, la relación entre la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa y los ácidos grasos no siempre existe, como fue descrito para anguilas transferidas a una mayor salinidad (Crockett, 1999).

c) Aminoácidos libres.

Otro mecanismo de osmorregulación en organismos acuáticos ante las fluctuaciones en la salinidad del medio, es el reajuste de los niveles de proteínas y aminoácidos libres en el medio extra e intra-celular, respectivamente (Watts *et al.*, 1996). Los organismos que son expuestos a un incremento en la salinidad del medio, produce un aumento en los niveles de aminoácidos libres en los tejidos, lo cual resulta en un equilibrio osmótico en relación con el medio hipersalino (Gilles, 1977; Marangos *et al.*, 1989; Nery y Santos, 1993; Watts *et al.* 1996; Okama y Abe, 1998). Los aminoácidos libres son los compuestos orgánicos que tienen mayor injerencia en los mecanismos de osmorregulación de crustáceos peneidos (Dall *et al.*, 1990). En *Penaeus vannamei* (McCoid *et al.*, 1984) y *P. japonicus* (Dalla-Via, 1986) se ha obtenido una relación lineal en el incremento de los aminoácidos libres en el tejido muscular con respecto al incremento en la salinidad en un intervalo de 10-50 ups. En otras especies de crustáceos se ha demostrado, que al ser transferidos a un ambiente diluido, los aminoácidos libres bajan en músculo y hepatopancreas (Okama y Abe, 1998), así como en hemolinfa (Gilles, 1977) y en nauplios de *Artemia* (Watts *et al.*, 1996). Una parte de estos aminoácidos son usados para la gluconeogénesis en branquias (Nery y Santos, 1993), mientras que el resto de ellos son utilizados para la síntesis de proteínas. Los principales aminoácidos libres que

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

participan en la osmorregulación son no esenciales como la glicina, prolina, alanina y taurina, sin embargo se puede encontrar aminoácidos esenciales como la arginina y la lisina (Marangos *et al.*, 1989; Dall *et al.*, 1990).

III. Justificación

La intensificación del cultivo del camarón en las zonas costeras y las densidades de organismos que actualmente se manejan dentro de los sistemas de producción demanda un eficiente control de las variables fisicoquímicas del agua en que los organismos se desarrollan y crecen hasta alcanzar tallas comerciales. La salinidad es una variable fisicoquímica muy importante dentro de los sistemas de producción, ya que puede influir en la supervivencia y el crecimiento de los organismos. Las variaciones de salinidad se encuentran estrechamente relacionadas con los cambios ambientales, y la supervivencia de los organismos con la capacidad de poder enfrentar fisiológicamente el estrés causado por la disminución o aumento en la salinidad. Esta capacidad está determinada en gran medida, por los mecanismos de osmorregulación, y en términos generales por la condición fisiológica de los organismos. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son constituyentes importantes de las membranas celulares, los cuales modulan la permeabilidad y su fluidez, así como la actividad de proteínas membranales. Sin embargo, la relación que existe entre éstos y principalmente el papel de los PUFA ante el estrés causado por las variaciones de la salinidad en juveniles de camarón es desconocida. Y más aún, es incierto si la condición fisiológica puede ser modulada a través de la alimentación y si esta permitirá incrementar la tolerancia a los cambios de salinidad.

Por lo anteriormente descrito, es importante evaluar el papel que desempeñan los PUFA en los mecanismos de osmorregulación del camarón con la finalidad de proponer estrategias de alimentación que a través de alimentos específicos, optimicen su cultivo a nivel comercial.

IV. HIPÓTESIS

- 1) La actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa se incrementa en juveniles de camarón blanco expuestos tanto a baja como a alta salinidad.

- 2) La actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa está modulada por la concentración de PUFA en las membranas branquiales.

- 3) La incorporación de PUFA en los distintos tejidos del camarón, incluyendo branquias, variará en función de la cantidad de ácidos grasos contenida en el alimento.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación de juveniles de camarón blanco, expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Objetivos Particulares

- 1) Evaluar el crecimiento, la supervivencia y la condición fisiológica de los organismos en condiciones de estrés crónico de baja y alta salinidad.
- 2) Analizar los mecanismos de osmorregulación durante la exposición aguda y crónica en baja y alta salinidad.
- 3) Determinar la influencia de la suplementación de PUFA sobre el crecimiento, la supervivencia, el FCA y la proporción de ácidos grasos en distintos tejidos.
- 4) Determinar el papel de los PUFA en las respuestas osmorreguladoras durante la exposición a estrés agudo y crónico en baja y alta salinidad.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Cultivo y aclimatación de juveniles a las condiciones de laboratorio.

Los juveniles de camarón utilizados en los experimentos se obtuvieron a partir del excedente del Programa de Mejoramiento Genético del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Los organismos de $3.5 \pm 0.5\text{g}$ fueron transferidos de los estanques supralitorales al “Laboratorio de Mejoramiento de Semillas” del CIBNOR para ser aclimatados en unidades experimentales (taras de plástico) de 0.25 m^2 y 60 litros de capacidad, las cuales constituyeron las réplicas de los experimentos. Se colocaron 16 organismos en cada una de las unidades experimentales, las cuales se cubrieron con maya de plástico tipo mosquitero para evitar que los organismos se estresaran y saltaran fuera de los estanques. La temperatura se mantuvo en 25.4°C (± 0.6) y la salinidad a 30 ups con recambio de agua del 80% diario. Los estanques tuvieron aireación constante para mantener la concentración de oxígeno disuelto cercano a la saturación (5-6 mg/mL). La alimentación consistió en alimento peletizado comercial con 35% proteína, el cual fue suministrado a saciedad en dos raciones diarias, iniciando con el 5% de la biomasa inicial. Transcurrido el tiempo de aclimatación de una semana en estas condiciones, se procedió con lo establecido en cada uno de los experimentos que se describe más adelante.

2. Alimentos experimentales.

Los alimentos experimentales consistieron en la formulación y fabricación de dos dietas balanceadas en forma de “pellets”, los cuales fueron enriquecidos con emulsiones de 0 y 50% de ácidos grasos poliinsaturados provenientes del ICES (Laboratory of Aquaculture and Reference Center, Bélgica). Los alimentos se formularon con la ayuda del paquete MIXIT-WIN® y se fabricaron de acuerdo con lo descrito por Goytortúa-Bores (2000), en base

a los requerimientos nutricios reportados por varios autores (Akiyama y Dominy, 1989; Camba *et al.*, 1993) para el camarón blanco *L. vannamei*. La composición del alimento se muestra en la Tabla II; mientras que la composición de vitaminas (Tabla XXX) y minerales (Tabla XXXI), así como la fabricación de los alimentos en el Anexo A.

Tabla II. Composición de los alimentos experimentales (g/100 g de alimento).

Ingrediente	0% PUFA	50% PUFA
Harina Int trigo (HIT0111-1)	40.000	40.000
Pasta de Soya (PS0111-1)	30.400	30.400
Harina de sardina (HP0111-1)	15.810	15.810
Grenetina (GRE0107-1)	4.000	4.000
Premezcla vitaminas Crustáceos	1.800	1.800
Fosfato dibasico de sodio	1.200	1.200
Premezcla Minerales Crustáceos	0.500	0.500
Cloruro de Colina 65%	0.200	0.200
Vitamina C 35%	0.090	0.090
BHT	0.004	0.004
Lecitina Soya (LS0107-1)	2.00	2.00
Emulsión ICES 0% PUFA	4.00	-
Emulsión ICES 50% PUFA	-	4.00

Los alimentos fueron analizados para conocer su composición química proximal, y a los cuales se les determinó: % de humedad (estufa a 70°C durante 24 horas), proteína cruda (micro Kjeldahl), extracto etéreo (Soxhlet), fibra cruda (hidrólisis sucesiva ácido-base), ceniza (mufla a 550°C durante 24 horas) y energía en un calorímetro adiabático PARR. Los análisis se hicieron por triplicado y de acuerdo a lo establecido en A.O.A.C (1995). El extracto libre de nitrógeno (E.L.N) se calculó por diferencia de acuerdo a lo descrito por Tacon (1990).

$$\text{E.L.N.} = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ ceniza} + \% \text{ fibra cruda})$$

En la Tabla III se muestran los resultados del análisis bromatológico de los alimentos. En ella se aprecia que los valores de los componentes analizados son similares entre alimentos (0 y 50% PUFA), por lo que la única diferencia es la composición de ácidos grasos.

Tabla III. Composición química próxima de los alimentos experimentales (0 y 50% PUFA).

PUFA (%)	Humedad (%)	Proteína* (%)	Ext. Etéreo* (%)	Ceniza* (%)	F. Cruda* (%)	E.L.N. (%)	Energía Cal/g
0	7.39 ± 0.63	36.63 ± 0.11	4.58 ± 0.36	6.3 ± 0.04	2.82 ± 0.01	49.8 ± 0.21	4616 ± 72
50	7.58 ± 0.11	36.21 ± 0.27	4.63 ± 0.52	6.2 ± 0.01	2.78 ± 0.01	50.3 ± 0.25	4643 ± 116

* Peso base seca

La composición de ácidos grasos de los alimentos se determinó de acuerdo a lo descrito por Palacios *et al.*, (2004a) (Anexo D). Los resultados de los análisis de ácidos grasos de la fracción neutra y polar se muestran en la Tabla IV. En ella se pueden apreciar las diferencias en el porcentaje de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) entre los dos alimentos (2.7% y 42.3% para 0 y 50% PUFA respectivamente en la fracción de lípidos neutros de los alimentos).

Tabla IV. Proporción de ácidos grasos (%) de la fracción neutra (LN) y polar (LP) de los alimentos peletizados con las emulsiones de 0 y 50% PUFA.

	0% PUFA		50% PUFA	
	LN	LP	LN	LP
14:0	7.46±0.63	1.43±0.17	1.05±0.24	0.84±0.13
16:0	19.68±0.29	22.51±0.94	10.65±0.46	19.93±0.72
18:0	4.71±0.14	4.10±0.21	3.47±0.23	4.03±0.29
16:1(n-9)	0.16±0.03	0.15±0.07	0.11±0.08	0.10±0.12
16:1(n-7)	2.28±0.06	1.01±0.06	1.65±0.28	1.22±0.18
18:1(n-9)	18.41±0.62	11.24±0.29	9.55±0.30	10.75±0.48
18:1(n-7)	2.08±0.05	1.66±0.12	1.86±0.14	1.70±0.10
20:1(n-9)	0.48±0.07	0.31±0.16	1.44±0.28	0.52±0.14
18:2(n-6)	34.76±0.84	46.24±0.90	19.29±0.80	44.26±2.49
18:3(n-3)	4.17±0.15	5.13±0.23	2.61±0.27	4.83±0.17
20:4(n-6)	0.35±0.06	0.40±0.25	0.90±0.21	0.63±0.20
20:5(n-3)	0.95±0.12	0.95±0.19	16.59±0.60	2.35±0.43
22:5(n-3)	N.D.	0.21±0.24	3.03±0.33	0.87±0.20
22:6(n-3)	1.37±0.12	1.76±0.24	18.47±0.71	4.07±1.05
Σ SAT.	33.65±0.60	30.13±1.22	17.04±0.46	26.82±0.52
Σ MONO	24.33±0.54	14.85±0.64	17.21±0.52	15.77±1.45
Σ PUFA	42.02±1.04	55.03±0.72	65.75±0.61	57.41±1.47
Σ HUFA	2.66±0.14	3.32±0.66	42.31±0.96	7.92±1.58
(n-3)/(n-6)	0.18±0.00	0.06±0.01	2.02±0.32	0.15±0.04
22:6/20:5	1.46±0.28	1.89±0.32	1.11±0.14	1.72±0.25
I. Insaturación	122±2	142±3	295±2	163±6

Sat: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

N.D.: No detectado.

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

A. PRIMER ESTUDIO (EXPOSICIÓN A ESTRÉS AGUDO): Papel de los PUFA en los mecanismos de osmorregulación ante estrés hipo- e hiper-osmótico y su efecto a corto plazo.

Transcurrido el tiempo de aclimatación y adaptación durante una semana de los juveniles de camarón a la condiciones de laboratorio antes descrita, se determinó el peso individual de cada organismo y se inició el suministro del alimento balanceado enriquecido con las emulsiones de referencia (0 y 50% PUFAS), el cual fue proporcionado en dos raciones diarias a saciedad aparente, iniciando con el 5% de la biomasa inicial y disminuyendo o aumentando la ración según el consumo. La temperatura se mantuvo a 25.4°C (± 0.6) y la salinidad a 30 ups, con recambio de agua del 80% diario. La temperatura y el oxígeno disuelto fueron monitoreados diariamente por la mañana a través de un oxímetro modelo YSI 50B previo al recambio de agua. Los organismos muertos en cada una de las unidades experimentales fueron desechados y remplazados con animales marcados de peso similar para mantener la densidad de cultivo constante durante todo el ensayo (los organismos marcados no fueron usados en los análisis químicos posteriores). Las heces fueron removidas diariamente, así como el alimento no consumido. Para calcular el factor de conversión alimenticia (F.C.A.), se cuantificó el alimento residual a simple vista por medio de una escala hecha a partir de porciones de alimento de peso conocido. Los organismos fueron sometidos a un fotoperiodo de 12 horas luz por 12 de oscuridad.

Al término de 21 días, los organismos fueron expuestos gradualmente a cada una de las salinidades de experimentación, considerando la salinidad de 30 ups como control, la salinidad de 5 ups como hiposmótica y la salinidad de 50 ups como hiperosmótica. Las salinidades se establecieron con base en los resultados obtenidos en un experimento preliminar en el cual se determinó el porcentaje de mortalidad a largo del tiempo en cinco

lotes de juveniles de camarón que se encontraban a una salinidad inicial de 30 ups al someterlos a estrés agudo en tres salinidades distintas (0, 55 y 65 ups), descartándose la salinidad de 65 ups por presentarse el mayor porcentaje de mortalidad (90%) después de 180 minutos (Tabla V).

Tabla V. Mortalidad (%) durante el estrés agudo: estudio preliminar.

Tiempo (minutos)	0 ups	55 ups	65 ups
30	1	0	1
60	1	1	7
90	4	8	18
120	9	13	37
150	24	15	63
180	36	19	90

El cambio de salinidad se hizo en las mismas unidades experimentales (taras) en donde se encontraban los organismos mediante un sistema de goteo por gravedad con un flujo de 0.72 L/h y con una razón de cambio en la salinidad de 1.6 ups/h. Como consecuencia, para lograr una salinidad de 5 ups se necesitaron aproximadamente 15.6 horas. y para la salinidad de 50 ups se necesitaron 12.5 horas. Este sistema fue previamente calibrado en ensayos preliminares para graduar el flujo necesario y lograr los cambios de salinidad, misma que fue monitoreada continuamente en todas las unidades experimentales hasta lograr las salinidades requeridas.

Muestreo

Concluida la transferencia de los camarones a las salinidades antes mencionadas, se procedió a su muestreo, sacrificio y preservación. Para esto, a los organismos se les privó de alimento 24 horas previo a la transferencia y sacrificio. En el muestreo se determinó el peso de cada individuo por medio de una balanza digital, eliminando el exceso de agua con una toalla de papel. A continuación se tomaron 10 μ L de hemolinfa de cada uno de los organismos por

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

medio de una micropipeta para la determinación de la presión osmótica (ver 1. Análisis en hemolinfa). El resto de la hemolinfa se extrajo con una jeringa hipodérmica enjuagada en oxalato de potasio como anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993) disuelto en solución isotónica de crustáceos (SIC: 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.3; Mendoza, 1992). Posteriormente se separó el plasma del tejido sanguíneo por medio de una microcentrífuga a 1000 x g durante 3 minutos y a una temperatura de 4°C, a continuación las muestras se conservaron a -20°C para posteriores análisis (ver análisis hemolinfa). Una vez extraída el resto de la hemolinfa se procedió al corte del último segmento del abdomen junto con los urópodos para identificar el estadio de muda a través de la observación directa del crecimiento de setas (Robertson *et al.*, 1987) con ayuda de un microscopio óptico. Posteriormente cada uno de los organismos se envolvió en papel aluminio, se etiquetó y se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C para análisis bioquímicos posteriores (ver análisis en tejidos).

El crecimiento fue estimado a partir del incremento de la biomasa al final de los experimentos en relación a la biomasa inicial de cada réplica. La supervivencia se cuantificó a partir del número final de organismos con respecto al número inicial en cada réplica. La densidad de cada réplica se mantuvo constante (16 organismos), sustituyendo continuamente los organismos muertos por otros marcados, los cuales no fueron muestreados al final del experimento. El factor de conversión alimenticia (FCA) se cuantificó de la siguiente manera:

$$FCA = \frac{\text{Alimento suministrado}}{\Delta \text{Biomasa corregida}}$$

Donde el incremento (Δ) de la biomasa fue corregido por el número de muertos de cada acuario de la siguiente forma:

$$(\Delta) \text{ Biomasa corregida} = \text{biomasa final por acuario} + [1/2 (\text{peso inicial promedio} - \text{peso final promedio}) * (\text{número de muertos})] - \text{biomasa inicial por acuario}$$

B. SEGUNDO ESTUDIO (EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO): Papel de los PUFAS en los mecanismos de osmorregulación ante estrés hipo- e hiper-osmótico y su efecto a largo plazo.

Este segundo experimento se realizó de forma similar al primero, sólo que en éste los organismos fueron paulatinamente *aclimatados* a las mismas salinidades experimentales (5, 30 y 50 ups) y mantenidos bajo estas condiciones durante un total de 21 días. Los alimentos, sistemas de cultivo, monitoreo de parámetros fisicoquímicos del agua, rutina de mantenimiento y muestreo de los organismos se realizó de la misma forma descrita con anterioridad en el primer estudio.

1. ANÁLISIS EN HEMOLINFA

1.1 PRESIÓN OSMÓTICA

La presión osmótica se determinó en la hemolinfa que fue obtenida a través de la punción en la membrana torácico-abdominal de los organismos previamente seca con papel absorbente, y de la cual se extrajeron 10 μ L de hemolinfa con la ayuda de una micro pipeta, mismos que se colocaron en un osmómetro de presión de vapor (Wescor OM 230B). Para los detalles del principio de la determinación de la presión osmótica consultar el Anexo B.

1.2. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Las muestras de plasma fueron descongeladas para determinar proteínas, hemocianina, glucosa y lactato. Estas dos últimas fueron analizadas por métodos enzimáticos con la ayuda de “kits” comerciales y de acuerdo a la metodología descrita por Racotta y Palacios (1998). Las proteínas totales fueron determinadas por Bradford (Bradford, 1976) con las modificaciones realizadas por (Racotta y Palacios, 1998) y la hemocianina de acuerdo a lo descrito por Chen *et al.*, 1994 con las modificaciones propuestas por Racotta y Hernández-Herrera (2000). Excepto para hemocianina, todas las técnicas utilizadas en el plasma de las muestras de hemolinfa fueron adaptadas en microplacas tipo “Elisa”, en las cuales se determinó absorbancia en un fotolorímetro BIORAD 550.

1.2.1 GLUCOSA

La concentración de glucosa se determinó de acuerdo al método (GOD-PAP, Randox) descrito en el “kit comercial”, el cual consiste en la oxidación enzimática (glucosa oxidasa) de la glucosa con la liberación de peróxido de hidrógeno que a su vez reacciona con fenol y 4-

amino fenazona en presencia de una peroxidasa, dando un cromógeno rojo violeta de antipirilquinonimina, que es proporcional a la cantidad de glucosa contenida en la muestra.

Se utilizaron 20 μ L de plasma y 200 μ L de solución reactiva, mismos que se dejaron reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción las microplacas se colocaron en el fotolorímetro para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. La curva tipo se elaboró a partir de la solución estándar cuya concentración es de 100 mg/dL (5.5 mmol/L) con las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.17825 mg/dL. Como blanco se utilizó SIC (solución salina isotónica de crustáceos (Mendoza, 1992); compuesta por 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.3).

1.2.2 LACTATO

La concentración de lactato se determinó con el método descrito en el “kit” comercial (PAP, Randox) el cual consiste en la oxidación del ácido láctico (lactato oxidasa) a piruvato con la consecuente formación de peróxido de hidrógeno que su a vez es oxidado por una peroxidasa, formando un cromógeno de color violeta que es directamente proporcional a la cantidad de lactato contenida en la muestra.

Se utilizaron 20 μ L de plasma y 200 μ L de solución reactiva, mismos que se dejaron reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, las microplacas se colocaron en el fotolorímetro para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. La curva tipo se hizo a partir de la solución estándar cuya concentración es de 20 mg/dL (2.22 mmol/L) con las siguientes concentraciones: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/dL. Como blanco se utilizó SIC (Mendoza, 1992).

1.2.3 PROTEINAS TOTALES

La concentración de proteínas se determinó haciendo una dilución 1:100 del plasma con SIC. A partir de esta dilución se tomaron 10 μL y 200 μL de solución reactiva de Bradford (Sigma), mismas que se dejaron reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, las microplacas se colocaron en el fotocolorímetro para determinar su absorbancia a longitud de onda 595 nm. Se utilizó una solución de albúmina sérica bovina como estándar con las siguientes concentraciones: 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL. Como blanco se utilizó SIC (Mendoza, 1992).

1.2.4 HEMOCIANINA

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). Posteriormente las muestras se colocaron en celdas de 1 mL y estas a su vez en espectrofotómetro para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 335 nm. La concentración se determinó de acuerdo al coeficiente de extinción ($E^{1\%}$) equivalente a 2.83 de una solución de hemocianina al 1% (1g/100 mL ó 10 mg/mL) en una fotocelda de 1cm (Chen *et al.* 1994; Racotta y Hernández-Herrera, 2000). La concentración de hemocianina se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Conc} = (\text{abs} * \text{Factor de dilución} * 10) / E\%$$

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.

2. ANÁLISIS EN TEJIDO MUSCULAR Y HEPATOPÁNCREAS

Los hepatopáncreas fueron divididos a la mitad para realizar los análisis bioquímicos y determinación de ácidos grasos. Mientras que del primer segmento abdominal del tejido muscular se extrajo una muestra. Ambos tejidos fueron disectados sobre una placa fría, pesados y liofilizados durante 24 horas. Una vez liofilizados, en el tejido muscular se calculó la cantidad de humedad y se determinó la concentración de proteínas (Bradford, 1976) y carbohidratos totales por el método de antrona (Roe, 1955). Mientras que en los hepatopáncreas se determinó la concentración de carbohidratos y proteínas (mismos métodos que en músculo), así como la concentración de carotenoides (Hatlen *et al.*, 1998) y triglicéridos (GPO-PAD, Randox) (Palacios *et al.*, 2000).

2.1. PROTEÍNAS

Las porciones liofilizadas de músculo fueron pulverizadas con la ayuda de una espátula. Posteriormente, alrededor de 10 mg de muestra fueron digeridos en 1 mL de NaOH 0.5N por 24 horas. De este último se tomaron 10 μ L y se le agregó 1 mL de solución reactiva de Bradford (Sigma). Se determinó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro. Se utilizó una solución de albúmina sérica bovina como estándar a concentraciones de: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 mg/mL. Como blanco se utilizó SIC (Mendoza, 1992).

Los hepatopáncreas liofilizados se homogenizaron en 1 mL de SIC y a partir de este se hizo una dilución 1:10 con NaOH 0.1 N por 24 horas. Transcurrido el tiempo de digestión, se tomaron 10 μ L de muestra y se procedió de igual manera que con las muestras de tejido muscular.

2.2. CARBOHIDRATOS

El resto del tejido muscular (aprox. 15 mg) fue homogenizado en 1 mL de ácido tricloracético (T.C.A.) al 6% por 2 horas. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1200 x g (3500 rpm) a 4°C por 15 minutos. Del sobrenadante se tomaron 10 µL a los que se les añadió 1 mL del reactivo de antrona 0.1% (disuelto en ácido sulfúrico al 76%). A continuación se dejaron en baño de agua caliente a 80°C por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se sumergieron en agua con hielo para detener la reacción. Se determinó la absorbancia a 620 nm. Se utilizó una solución de dextrosa como estándar en concentraciones de: 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL. Como blanco se utilizó SIC.

Del homogenizado de hepatopáncreas en SIC se tomaron 0.5 mL, los cuales fueron diluidos 1:2 con T.C.A. al 12% por 2 horas. El resto del proceso de las muestras se realizó de forma semejante al efectuado con el tejido muscular, con un tiempo de incubación en el baño de agua caliente de 2 minutos, y en este se utilizaron concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 mg/mL.

2.3. CAROTENOIDES

Estos sólo se determinaron en las muestra de hepatopáncreas y se determinaron de acuerdo a lo descrito por Hatlen *et al.*, 1998. A partir de los homogenizados se tomaron 100 µL y se les agregó 1 mL de acetona. Las muestras se dejaron reposar por 24 horas a temperatura ambiente y evitando el contacto con la luz. Transcurrido este tiempo se les agregó aproximadamente 0.2 g de sulfato de sodio y se centrifugaron a 1600 x g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se utilizó para determinar absorbancia a 475 nm en fotocelda de cuarzo de 1 cm. Se utilizó acetona como blanco. La concentración se calculó de la sig.

manera: concentración ($\mu\text{g/g}$) = $(\text{abs} \cdot 10) / (0.19 \cdot \text{g de tejido})$. Donde 10 es el factor de dilución y el 0.19 es el coeficiente de extinción $E^{1\%}$.

2.4. TRIGLICÉRIDOS

Al igual que en carotenoides, los triglicéridos sólo se determinaron en las muestras de hepatopáncreas. Se tomaron 20 μL del homogenizado y se colocaron en microplacas; posteriormente se les agregó 200 μL de solución reactiva del kit comercial (GPO-PAP, Randox) y se dejaron reaccionar por 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción las microplacas se colocaron en el fotocolorímetro para determinar su absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. La curva tipo se hizo a partir de la solución estándar incluida en el “kit” y cuya concentración es de 200 mg/dL (2.29 mmol/L) con las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 25, 12.5 mg/dL. Como blanco se utilizó SIC (Mendoza, 1992).

2.5. ÁCIDOS GRASOS

El resto de los hepatopáncreas (tejido fresco) de cada organismo se colocó en 6 mL de solución Folch (1975) (cloroformo: metanol, 2:1 v/v) y se guardaron a -20°C . A cada uno de ellos se le agregó 10 μL de BHT (0.5 mg/mL) y 10 μL del ácido graso 23:0 (2 mg/mL) como estándar interno. Transcurrido como mínimo 24 horas en la solución Folch, cada órgano fue disgregado con la ayuda de un homogenizador de vidrio, homogenizado con ayuda de un vortex y posteriormente los lípidos extraídos fueron separados y derivatizados como se describe en Palacios *et al.* (2004a) (Ver detalles Anexo E) y cuyo procedimiento se resume brevemente a continuación:

a) Separación de lípidos.

El homogenizado fue separado en dos partes, una de ellas (3 mL) se guardó como respaldo, mientras que en los 3 mL restantes fueron separados los lípidos neutros de los polares usando cloroformo:metanol (98:2) y metanol respectivamente en microcolumnas preparadas con micropipetas Pasteur rellenas de fibra de vidrio y sílice hidratado al 6%.

b) Derivatización.

Las muestras se sometieron a derivatización con BF₃ (Trifloruro de Boro) por 15 minutos a 95°C. La extracción de los metil-ésteres de los ácidos grasos se realizó en hexano y se analizaron en un cromatógrafo de gases HP G 1800B equipado con una columna polar DBMAX, usando helio como gas acarreador.

3. ANÁLISIS EN BRANQUIAS

3.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad de la enzima Na⁺/K⁺ ATPasa se determinó de acuerdo al método descrito por Holliday *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Se disectaron las branquias de los camarones en frío, las cuales fueron separadas en anteriores y posteriores. Estas a su vez fueron liofilizadas por 24 horas y posteriormente homogenizadas en una solución 0.25 M de sacarosa y 6 mM de TRIS. La actividad se determinó como la diferencia del fosfato liberado (Pi) por la actividad de la Na⁺/K⁺ ATPasa y el fosfato libre contenido en el tejido (Detalles Anexo C).

3.2. *PROTEÍNAS*

Del mismo homogenizado de branquias se tomaron 10 μL y se hizo una dilución 1:5 con NaOH 0.1N. Se dejó reposar por 2 horas. El resto del análisis se realizó como se describe en la sección 2.1 para el tejido muscular.

3.3. *ÁCIDOS GRASOS*

El análisis de ácidos grasos en las branquias se realizó de la misma forma que para las muestras de hepatopáncreas, tanto la separación de las fracciones de lípidos neutros y polares, como la derivatización. (Detalles Anexo E).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar las diferencias de crecimiento, supervivencia, factor de consumo alimenticio y composición bioquímica en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas, y la proporción y concentración de ácidos grasos de la fracción neutra y polar del tejido branquial y de hepatopáncreas se usaron análisis de varianza (ANOVA) bifactoriales, donde los factores fijos fueron la salinidad (S) con tres niveles (5, 30 y 50 ups) y la alimentación (A) con dos niveles (0 y 50% PUFA). Sólo en caso de obtener valores significativos de interacción de factores, se procedió a la comparación de medias individuales por medio de pruebas *a posteriori* de Tukey, las cuales se muestran con letras en cada una de las Tablas y Figuras. En caso de obtener efectos significativos de cualquiera de los dos factores, la comparación se limitó a medias globales, i.e. de las tres salinidades independientemente de la alimentación con PUFA; o de los niveles de PUFA, independientemente de la salinidad.

Todos los resultados están presentados como media \pm error estándar (EE). Los resultados en porcentaje fueron transformados por medio de arcoseno para el análisis estadístico, aunque únicamente se muestran los resultados en porcentaje. Los análisis estadísticos se hicieron con un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$).

VIII. RESULTADOS

1. PRIMER ESTUDIO (*Exposición a estrés agudo*)

1.1 Temperatura y Oxígeno

La temperatura del agua promedio diaria del total de los acuarios utilizados en este estudio se mantuvo en los 25.5°C (± 0.6), con una tendencia a disminuir hacia el final del experimento (Fig. 3), dado que la temperatura no fue controlada por medio de termostatos, sino que se aprovechó la temperatura ambiental del laboratorio en donde se mantuvieron los acuarios.

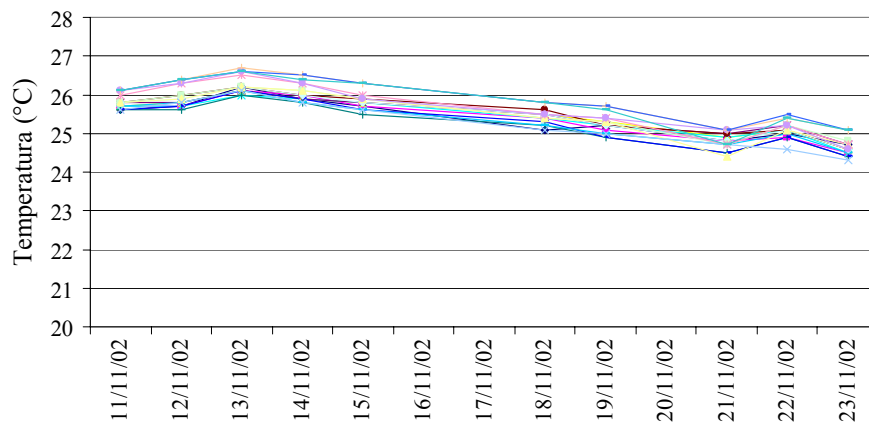


Fig.3 Temperatura (°C) del agua en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés agudo.

La concentración de oxígeno del agua en los acuarios de este experimento se mantuvo constante durante el tiempo que duró el ensayo, en promedio se mantuvo a 5.97 ± 0.05 mg/mL, valores que están próximos a la saturación (Fig. 4).

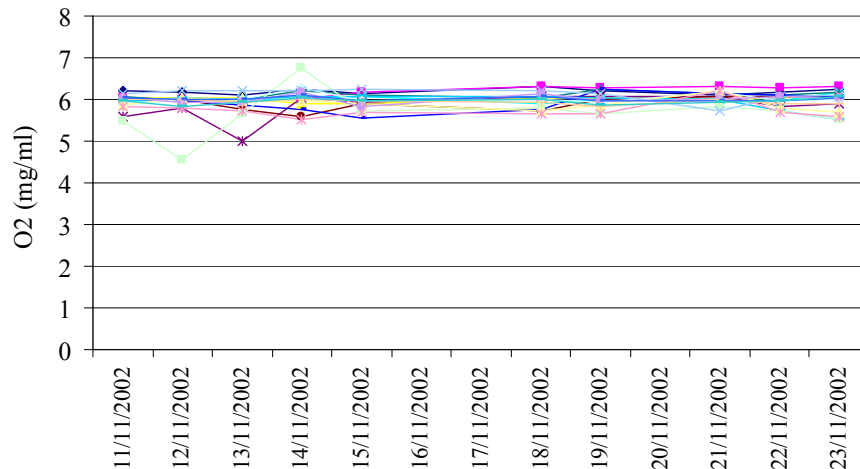


Fig.4 Concentración del oxígeno (mg/mL) en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés agudo.

1.2 Crecimiento, Supervivencia y Factor de Conversión Alimenticio

Tanto el crecimiento como la supervivencia de los organismos no se resultó afectada a los cambios de salinidad, las cuales se calcularon al término de los 21 días de cultivo, previo al estrés hipo- e hipersalino. El porcentaje de crecimiento en peso de los organismos fue de 18.1 ± 2.0 , mientras que la supervivencia fue mayor al 80% a lo largo del cultivo. El estrés salino al que fueron expuestos los organismos no comprometió la supervivencia, ya que esta fue del 100% al momento del cambio de salinidad. En relación a la alimentación no se observaron diferencias en el crecimiento y en la supervivencia durante el cultivo, sin embargo la supervivencia fue ligeramente mayor en los organismos alimentados con el alimento de 50% PUFA. El factor de conversión alimenticio resultó particularmente alto, sin que se observaran diferencias en relación al tipo alimento (4.2 ± 0.4 y 4.2 ± 0.8 para 0 y 50% PUFA, respectivamente).

1.3 Análisis Bioquímicos

Los resultados de la composición bioquímica en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas se muestran en las Tablas VI a VIII.

1.3.1 Hemolinfa

La salinidad del medio afectó significativamente ($P < 0.001$) la presión osmótica de los organismos, la cual se incrementa conforme aumenta la salinidad del medio al cual fueron transferidos (Tabla VI). No se observaron diferencias significativas en la presión osmótica en relación al alimento o en la interacción entre factores.

La concentración de lactato fue afectada por la salinidad (medias globales = 8.1, 12.6 y 10.7 mg/dL para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.01$) y por el alimento (medias globales = 11.7 y 9.1 mg/dL para 0 y 50%, respectivamente; $P < 0.01$). Los organismos alimentados con 0% PUFA tuvieron mayor concentración de lactato en la hemolinfa, particularmente a 30 y 50 ups, como se muestra por la interacción significativa ($P = 0.015$).

La concentración de glucosa fue significativamente menor en los organismos expuestos a estrés de hiposalinidad (medias globales = 25.9, 49.5, 41.1 mg/dL para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas por efecto del alimento.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas y hemocianina, aunque esta última mostró una tendencia a ser mayor en los organismos que fueron expuestos a baja o alta salinidad, la cual se reflejó en la relación hemocianina/proteína significativamente más alta en el grupo de los organismos expuestos a 30 ups, en comparación a los sometidos a 5 y 50 ups.

Tabla VI. Presión osmótica y análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en la hemolinfa de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Presión osmótica (mmol/kg)	640 \pm 5	759 \pm 15	841 \pm 13	640 \pm 5	743 \pm 15	830 \pm 6	0.000	0.318	0.725
Lactato (mg/dL)	7.92 \pm 0.57 ^b	14.33 \pm 1.18 ^a	13.34 \pm 1.78 ^a	8.36 \pm 0.90 ^b	10.92 \pm 0.48 ^{ab}	7.98 \pm 0.40 ^b	0.000	0.001	0.015
Glucosa (mg/dL)	27.0 \pm 4.1	58.2 \pm 6.2	38.9 \pm 3.3	24.8 \pm 2.2	40.7 \pm 5.6	43.19 \pm 5.0	0.000	0.157	0.054
Hemocianina (mg/mL)	59.8 \pm 5.1	64.7 \pm 5.5	57.5 \pm 2.6	58.0 \pm 5.2	74.8 \pm 13.5	57.9 \pm 1.2	0.059	0.461	0.523
Proteína (mg/mL)	114 \pm 5	109 \pm 2	108 \pm 4	108 \pm 5	113 \pm 18	107 \pm 2	0.466	0.369	0.605
Hemocianina/Proteína (%)	54 \pm 3	66 \pm 12	53 \pm 2	53 \pm 3	66 \pm 6	54 \pm 1	0.036	0.887	0.876

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las letras indican las diferencias.

1.3.2 Músculo

En músculo no se encontraron diferencias significativas en la humedad (%) y en la concentración de proteínas (mg/g) con respecto a la salinidad (5, 30 y 50 ups) o a la alimentación (0 y 50% PUFA). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas con respecto a la salinidad en la concentración de carbohidratos con valores significativamente mayores a 50 ups en ambos niveles de PUFA (medias globales: 21.7, 22.3 y 30.1 mg/g para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.01$).

Tabla VII. Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en músculo de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Humedad (%)	78.4 \pm 0.4	76.8 \pm 2.3	75.5 \pm 0.3	77.8 \pm 0.8	80.2 \pm 3.0	75.4 \pm 0.4	0.135	0.516	0.417
Proteína* (mg/g)	694 \pm 18	702 \pm 20	688 \pm 18	698 \pm 19	713 \pm 20	674 \pm 18	0.388	0.990	0.786
Carbohidratos* (mg/g)	18.4 \pm 1.9	21.6 \pm 2.4	30.0 \pm 3.3	24.9 \pm 2.4	23.0 \pm 3.1	30.0 \pm 2.2	0.002	0.193	0.428

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las letras indican las diferencias. *Valores en peso seco.

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

1.3.3 Hepatopáncreas

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos con respecto a la salinidad (medias globales = 65.6, 55.2 y 51.2 mg/g para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$). La mayor concentración se observó a 5 ups para ambos niveles de enriquecimiento (0 y 50% PUFA).

Se encontró una interacción significativa de salinidad vs. alimentación (SxA) para el porcentaje de humedad ($P < 0.005$) y para la concentración de carbohidratos ($P < 0.05$) en hepatopáncreas (Tabla VIII). En ambos casos, la interacción indica que la disminución del % de humedad y de los carbohidratos a 50 ups ocurre únicamente en la condición de alimentación de 0% PUFA, dado que a 50% PUFA el efecto tiende a ser el contrario, con un incremento a 50 ups. Esto se observa de manera más clara en el % de humedad por una diferencia significativa entre las medias de 0 y 50% PUFA, únicamente en los organismos expuestos a 50 ups.

La concentración de carbohidratos fue mayor en organismos expuestos a 30 ups y alimentados con 0% PUFA.

No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas y carotenoides con respecto a salinidad y/o alimentación.

Tabla VIII. Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en hepatopáncreas de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Humedad (%)	75.2 \pm 0.8 ^{ab}	76.6 \pm 0.6 ^a	72.2 \pm 1.6 ^b	74.8 \pm 1.2 ^{ab}	74.6 \pm 1.0 ^{ab}	77.1 \pm 0.8 ^a	0.640	0.324	0.003
Proteína* (mg/g)	202 \pm 10	197 \pm 14	173 \pm 9	203 \pm 14	203 \pm 12	187 \pm 10	0.113	0.476	0.847
Carbohidratos* (mg/g)	103 \pm 5 ^{ab}	121 \pm 9 ^a	90 \pm 5 ^b	92 \pm 8 ^b	95 \pm 4 ^b	100 \pm 4 ^{ab}	0.078	0.064	0.014
Carotenoides* (μ g/g)	609 \pm 73	642 \pm 72	657 \pm 45	506 \pm 44	663 \pm 75	565 \pm 50	0.300	0.253	0.532
Triglicéridos* (mg/g)	62.4 \pm 4.0	59.3 \pm 4.9	49.1 \pm 4.5	62.7 \pm 4.6	51.0 \pm 3.3	53.3 \pm 4.2	0.032	0.715	0.330

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las letras indican las diferencias. *Valores en peso seco.

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

1.3.4 Branquias

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de humedad en branquias anteriores con respecto a la salinidad (Tabla IX), con valores significativamente más altos a 5 ups comparado con las otras dos salinidades (medias globales = 83.3, 81.4 y 82.2 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$). En branquias posteriores no se observaron diferencias significativas en el contenido de humedad con respecto a ninguno de los factores. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas (mg/g) tanto en branquias anteriores como en posteriores con respecto a la salinidad (medias globales para anteriores = 138.0, 134.5 y 115.6 para 5, 30 y 50 ups; respectivamente ($P < 0.001$) y para posteriores = 155.4, 154.2 137.5 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.001$), donde se observa que la concentración de proteínas en branquias anteriores y posteriores fueron significativamente menores a 50 ups. En términos generales se encontró mayor concentración de proteína en las branquias posteriores, aunque no se realizó una comparación estadística.

No se observaron diferencias significativas en la actividad específica de la ATPasa con respecto a la salinidad o alimentación, tanto en branquias anteriores como en posteriores. Tanto la actividad total como la específica de esta enzima fue en general mayor en las branquias anteriores que en las posteriores (Tabla IX), aunque no se realizó una comparación estadística.

Tabla IX. Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en branquias anteriores (a) y posteriores (p) de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

		0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
		5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Humedad (%)	a	83.6 \pm 0.4	81.4 \pm 1.2	82.4 \pm 0.3	83.0 \pm 0.4	81.5 \pm 0.9	82.0 \pm 0.6	0.035	0.634	0.892
	p	84.2 \pm 0.4	83.0 \pm 0.7	82.6 \pm 0.4	83.5 \pm 0.5	83.7 \pm 0.5	84.0 \pm 0.8	0.542	0.310	0.171
Proteína* (mg/g)	a	128.0 \pm 4.2	136.5 \pm 5.1	114.4 \pm 4.8	148.1 \pm 8.3	132.7 \pm 5.0	116.7 \pm 3.5	0.000	0.167	0.077
	p	151.9 \pm 5.3	154.3 \pm 8.5	134.3 \pm 5.0	158.9 \pm 6.9	154.2 \pm 5.1	140.7 \pm 4.7	0.006	0.374	0.811
Actividad total* (μ MPi g ⁻¹ h ⁻¹)	a	14.59 \pm 1.60	13.11 \pm 1.36	10.74 \pm 1.71	11.63 \pm 1.72	12.22 \pm 1.25	10.88 \pm 1.26	0.274	0.314	0.576
	p	6.33 \pm 1.04	6.56 \pm 1.42	4.96 \pm 1.39	4.72 \pm 1.29	7.01 \pm 1.07	5.00 \pm 1.12	0.331	0.712	0.672
Actividad específica (μ MPi mg ⁻¹ prot.)	a	0.12 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.929	0.165	0.203
	p	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.489	0.491	0.774

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las letras indican las diferencias. *Valores en peso seco.

1.4 Composición de ácidos grasos en hepatopáncreas y branquias.

La composición de los principales ácidos grasos de las fracciones neutra y polar del tejido branquial y de hepatopáncreas se muestran en las Figuras 5 a 20, mientras que el resto de ácidos grasos en estos tejidos se muestran las Tablas del Anexo F.

Del total de ácidos grasos identificados en hepatopáncreas y branquias, se consideró y graficó (media \pm error estándar) únicamente el porcentaje molar de los siguientes ácidos grasos altamente insaturados (HUFA): el 20:4(n-6) (araquidónico), el 20:5(n-3) (eicosapentaenoico) y el 22:6(n-3) (docosahexaenoico) así como el índice de insaturación de la fracción neutra y polar. Se seleccionaron estos como posibles indicadores del efecto por salinidad y/o alimentación a la que fueron expuestos los camarones, así como por su posible participación directa o indirecta en la modulación de la actividad de la ATPasa.

1.4.1 Hepatopáncreas: Fracción Neutra.

No se observaron diferencias significativas por salinidad o alimentación, pero sí por la interacción de factores (SxA) en el porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) de la fracción neutra en hepatopáncreas (Fig.5). La probabilidad de interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) se encuentra en el límite de la significancia, por lo que el análisis *a posteriori* de Tukey no fue lo suficientemente sensible para discriminar entre medias y no se incluyó en la gráfica. Sin embargo, esta interacción posiblemente se debe a una disminución del ácido araquidónico cuando los organismos fueron expuestos a 50 ups, únicamente en la condición de alimentación de 0% PUFA, la cual no se presenta en los organismos alimentados con 50% PUFA.

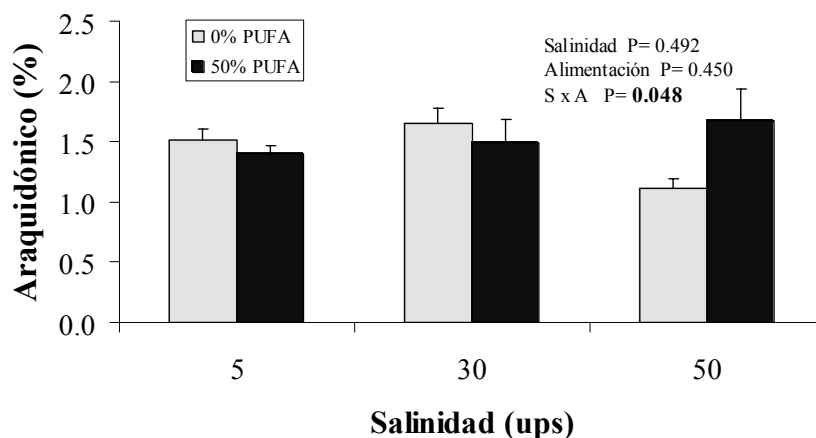


Fig. 5 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) de la fracción neutra en hepatopáncreas con respecto a la salinidad, pero sí con respecto a la alimentación. Se observa que el porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) es entre un 30 y 40% más alto en los organismos alimentados con 50% PUFA en relación a el alimento con 0% PUFA (medias globales = 3.3 y 10.3 para 0 y 50%, respectivamente) (Fig.6).

En la interacción SxA no se observaron diferencias significativas, pero sí se encontró una tendencia ($P= 0.058$).

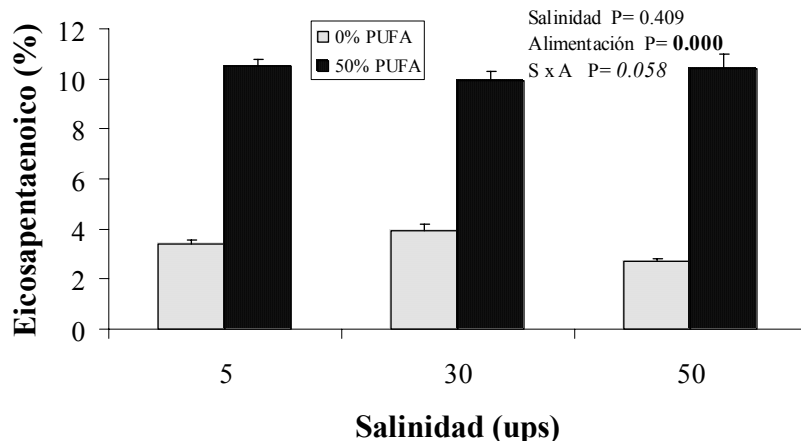


Fig. 6 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) de la fracción neutra en hepatopáncreas con respecto a la salinidad, pero sí con respecto a la alimentación (Fig.7). El porcentaje molar de este ácido graso en los hepatopáncreas de los organismos alimentados con el alimento de 0% PUFA fue menor en relación a los organismos alimentados con 50% PUFA (medias globales = 4.7 vs. 12.4, respectivamente). Por otro lado, la interacción entre los factores salinidad vs. alimentación (SxA) fue significativa. Esto se debe a que sólo en la dieta de 0% PUFA hubo cierta variación por efecto de la salinidad con los niveles más bajos a 5 ups y los más altos a 30 ups, con valores intermedios a 50 ups.

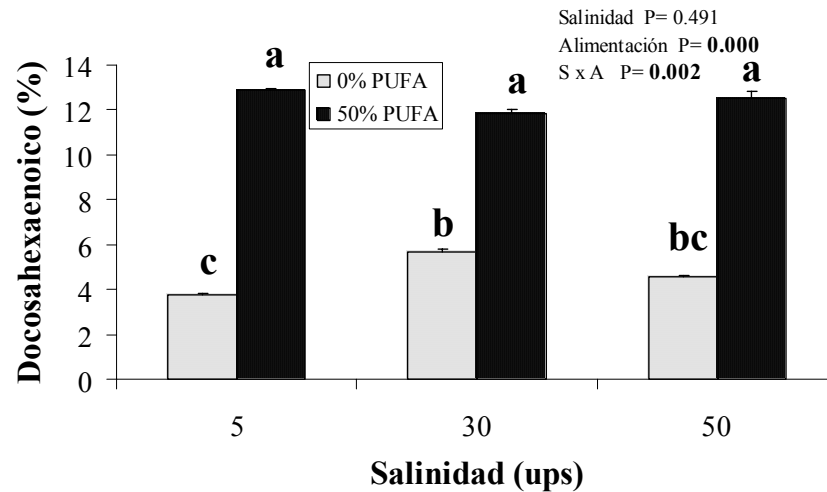


Fig. 7 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

No se encontraron diferencias significativas en el índice de insaturación de la fracción neutra en hepatopáncreas con respecto a la salinidad, pero en relación a la alimentación y la interacción entre factores (salinidad vs. alimentación). El índice de insaturación fue claramente mayor en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA (media global = 226) que en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con 0% PUFA (media global = 146). En el caso de estos últimos, el índice de insaturación disminuyó a 5 ups (143 ± 2) y 50 ups (142 ± 3) con respecto al control a 30 ups (154 ± 3), mientras que en los primeros el índice de insaturación se mantuvo a 50 ups (224 ± 3) y aumentó a 5 ups (232 ± 1) con respecto al control (30 ups) (223 ± 2) (Fig. 8).

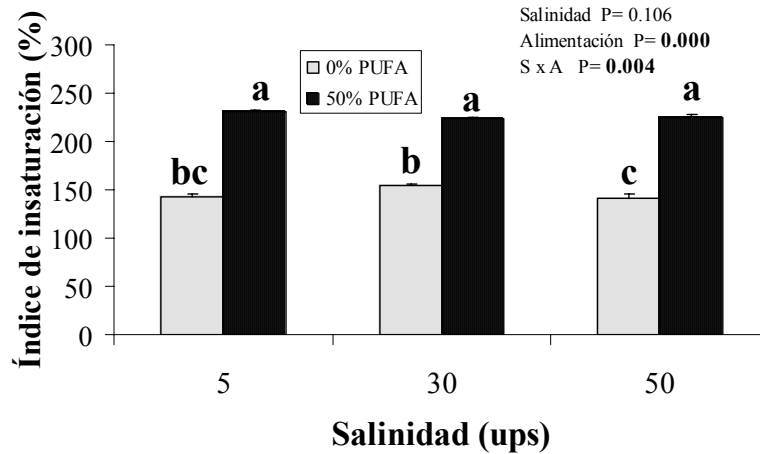


Fig.8 Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

1.4.2 Hepatopáncreas: Fracción Polar.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido araquidónico en la fracción polar en hepatopáncreas con respecto a la salinidad, alimentación e interacción de factores (salinidad vs. alimentación) (Fig.9)

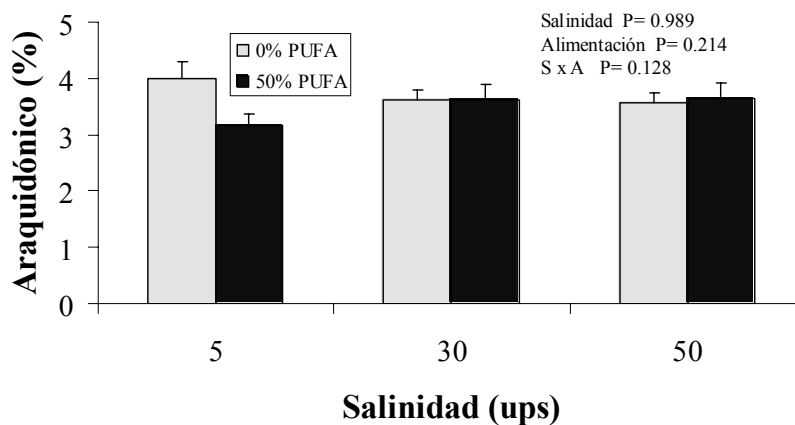


Fig.9 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas.

No se encontraron diferencias significativas en la fracción polar en hepatopáncreas del porcentaje del ácido graso 20:5(n-3) con respecto a la salinidad ni a la interacción de factores (salinidad vs. alimentación), pero sí con respecto a la alimentación (medias globales = 9.5 y 22.4% para 0 y 50% PUFA, respectivamente, $P < 0.001$) (Fig.10). El porcentaje molar de ácido graso eicosapentaenoico de los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA es aproximadamente el doble del encontrado en los hepatopáncreas de los organismos alimentados con el de 0% PUFA.

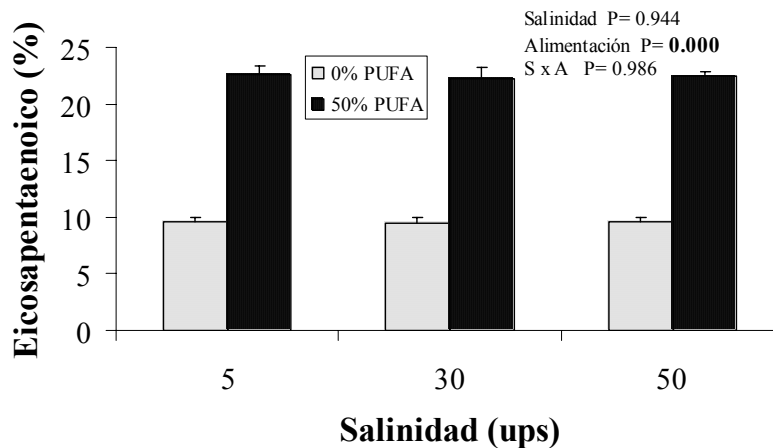


Fig.10 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de la fracción polar en hepatopáncreas del ácido graso 22:6(n-3) con respecto a la salinidad con valores más bajos a 5 ups (medias globales = 14.4, 17.0 y 17.6% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P = 0.001$) (Fig.11). También se observó que la proporción de 22:6(n-3) fue dos veces más alta con el alimento de 50% PUFA (medias globales = 11.5 y 21.2% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no fue significativa.

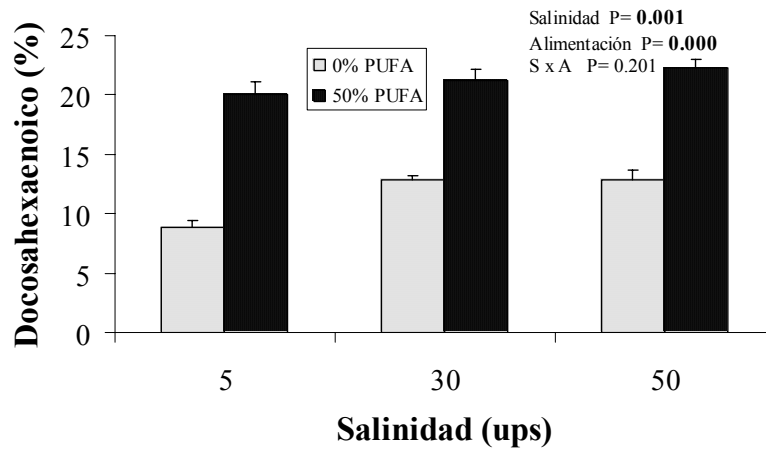


Fig.11 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias significativas en el índice de insaturación de la fracción polar en hepatopáncreas con respecto a la salinidad (medias globales = 261.9, 275.7 y 278.3 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$) y alimentación (medias globales = 227.1 y 316.9 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig.12), mientras que la interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no resultó significativa. El índice de insaturación encontrado en los hepatopáncreas de los organismos alimentados con el alimento de 0% PUFA es menor con respecto a los alimentados con el alimento de 50% PUFA y disminuye en relación a la salinidad.

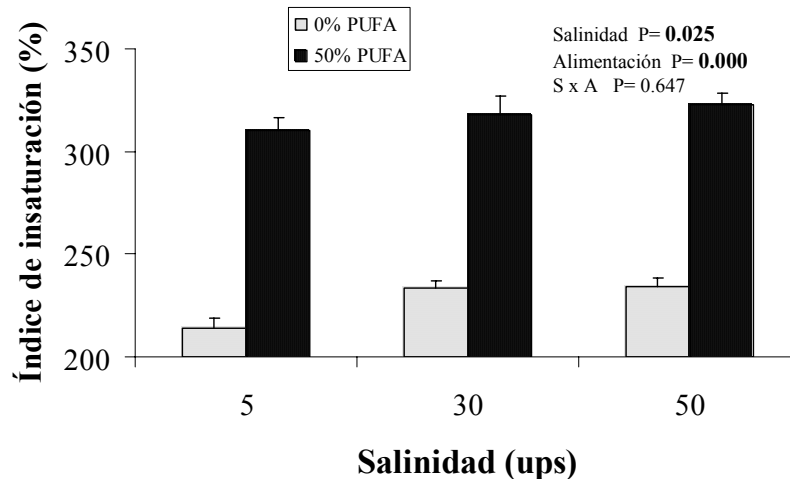


Fig.12 Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas.

1.4.3 Branquias: Fracción Neutra

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción neutra en branquias totales con respecto a la salinidad o alimentación, aunque en relación a esta última se observó una tendencia ($P=0.060$) (Fig.13). En los organismos alimentados con la dieta de 50% PUFA disminuyó ligeramente con respecto a los alimentados con la dieta de 0% PUFA (medias globales = 6.1 vs. 5.5%, para 0 y 50% PUFA, respectivamente). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no resultó significativa.

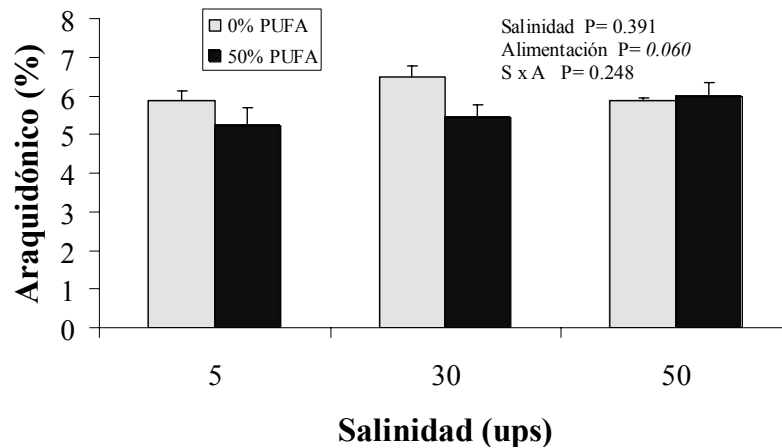


Fig.13 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción neutra en branquias totales con respecto a la salinidad o a la interacción entre factores (salinidad vs. alimentación), mientras que con respecto a la alimentación sí hay diferencias significativas (medias globales = 19.1 vs. 23.7 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig.14).

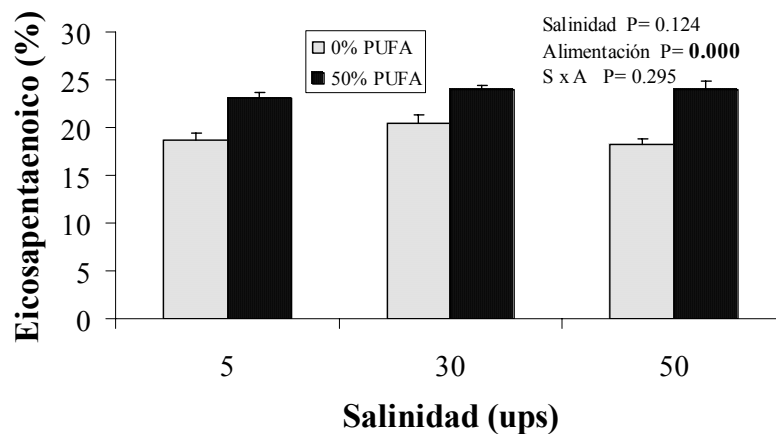


Fig.14 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción neutra en branquias totales con respecto a la salinidad o en la

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

interacción entre factores (salinidad vs. alimentación), mientras que con respecto a la alimentación sí se encontraron diferencias significativas (medias globales = 13.1 vs. 16.8 para 0 y 50% PUFA ($P < 0.001$)) (Fig.15). A pesar de no encontrarse diferencias significativas con respecto a la salinidad, se observó una ligera tendencia ($P = 0.103$) al incremento de 22:6(n-3) en organismos controles con respecto a aquellos expuestos a estrés hipo- e hipersalino (medias globales = 14.8, 15.5 y 14.6% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente).

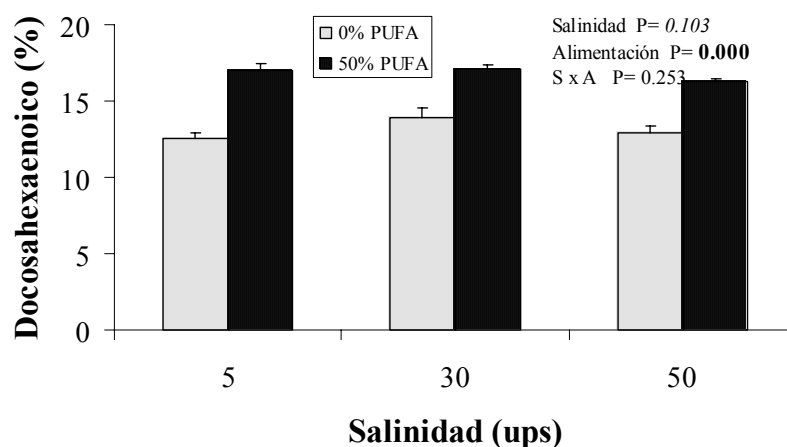


Fig.15 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

Se encontraron diferencias significativas en el índice de insaturación de la fracción neutra en branquias con respecto a la salinidad (medias globales = 288, 298 y 289 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$) y alimentación (medias globales = 276 y 307 para 0 y 50% PUFA; $P < 0.001$) (Fig.16). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) también fue significativa y los resultados del análisis *a posteriori* de Tukey se muestran en la gráfica. Se observó que el índice de insaturación en las branquias de los organismos alimentados con el alimento de 0% PUFA disminuyó significativamente tanto a 5 ups (271 ± 4) como a 50 ups (269 ± 5) con respecto al control a 30 ups (288 ± 6), mientras que en las branquias de los

organismos que fueron alimentados con 50% PUFA no observaron diferencias significativas.

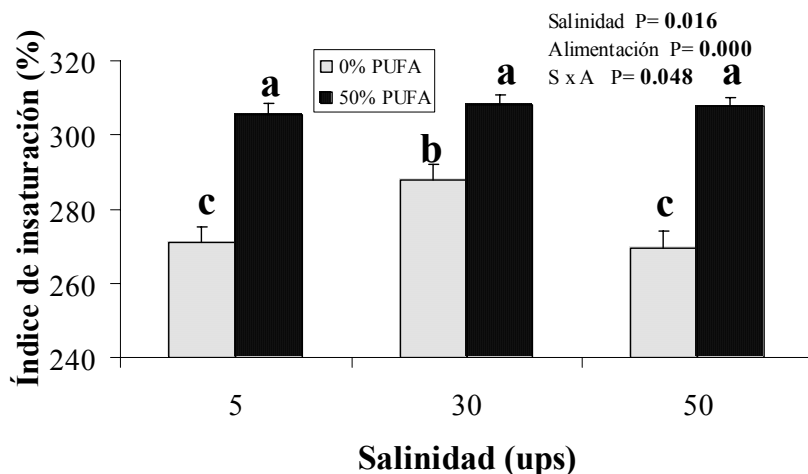


Fig.16 Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

1.4.4 Branquias: Fracción polar.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción polar en branquias con respecto a la salinidad y alimentación (Fig.17). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no fue significativa, pero se consideró como tendencia ($P=0.093$). El porcentaje molar de este ácido graso en las branquias de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 0% PUFA presentó una tendencia a disminuir conforme aumentó la salinidad, 5 ups (4.00 ± 0.27); 30 ups (3.94 ± 0.28); 50 ups (3.45 ± 0.24), mientras que en los organismos alimentados con el alimento de 50% PUFA se observó lo contrario, una tendencia a incrementar el porcentaje molar del 20:4(n-6) conforme aumentó la salinidad, 5 ups (3.84 ± 0.22); 30 ups (4.04 ± 0.23), 50 ups (4.38 ± 0.23).

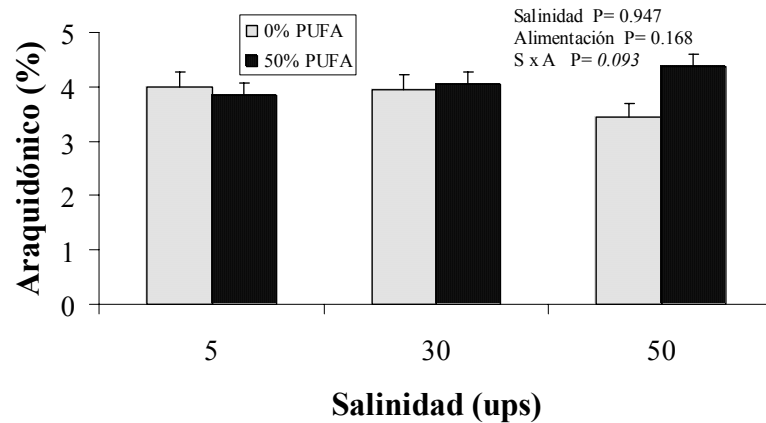


Fig. 17 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción polar en branquias con respecto a la salinidad, mientras que con respecto a la alimentación sí se encontraron diferencias significativas (medias globales = 12.9 vs. 19.9% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig.18). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) también resultó significativa ($P < 0.05$), debido principalmente a que en los organismos alimentados con 0% PUFA, el porcentaje de 20:5(n-3) disminuyó a 50 ups (12.05 ± 0.45) en comparación con la salinidad control (13.53 ± 0.43), mientras que en la dieta de 50% PUFA, el porcentaje es mayor a 50 ups (20.54 ± 0.20) que a 30 ups (19.78 ± 0.53).

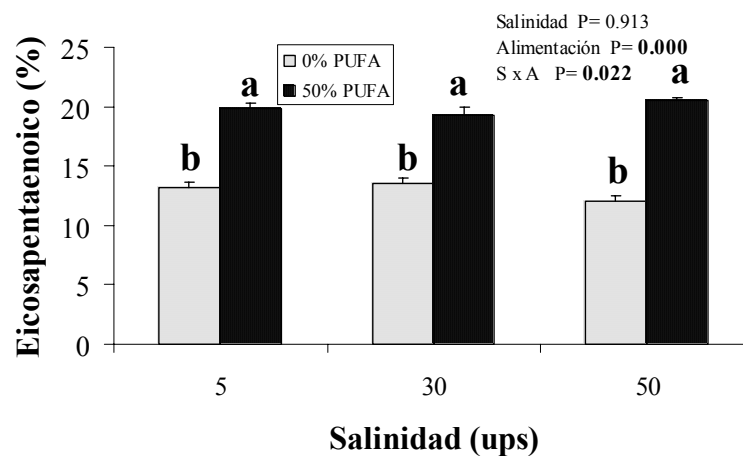


Fig. 18 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción polar en branquias con respecto a la salinidad, mientras que en relación a la alimentación las diferencias fueron significativas (medias globales = 9.2 vs. 13.8 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig.19). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) resultó no significativa, pero sí se aprecia una tendencia ($P = 0.078$). El porcentaje de este ácido graso en las branquias de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 0% PUFA disminuyó tanto a 5 ups (8.05 ± 0.37) como a 50 ups (9.19 ± 0.71) con respecto al control a 30 ups (10.38 ± 0.51), y esta disminución fue mayor a 5 ups que a 50 ups. En contraste, en las branquias de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA el porcentaje del 22:6(n-3) se mantuvo a 5 ups (13.70 ± 0.68) y presentó una tendencia a aumentar a 50 ups (14.16 ± 0.26) con respecto al control (30 ups) (13.57 ± 0.52).

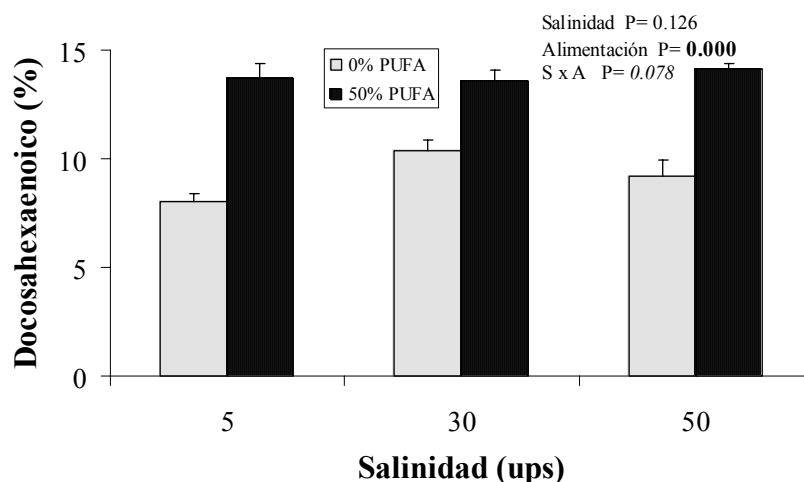


Fig.19 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias.

No se observaron diferencias significativas en el índice de insaturación en la fracción polar de branquias en relación a la salinidad, mientras que con respecto a la alimentación las diferencias son significativas (medias globales = 208.4 vs. 254.0 para 0 y 50% PUFA,

respectivamente; $P < 0.001$) (Fig.20). El índice de insaturación en las branquias de los organismos que fueron alimentados con la dieta de 0% PUFA disminuyeron tanto a 5 ups (205 ± 4) como a 50 ups (205 ± 5) con respecto al control (30 ups) (216 ± 4), mientras que en los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA el índice de insaturación en las branquias aumentó tanto a 5 ups (253 ± 2) como a 50 ups (259 ± 2) con respecto al control a 30 ups (251 ± 4) ($P < 0.05$).

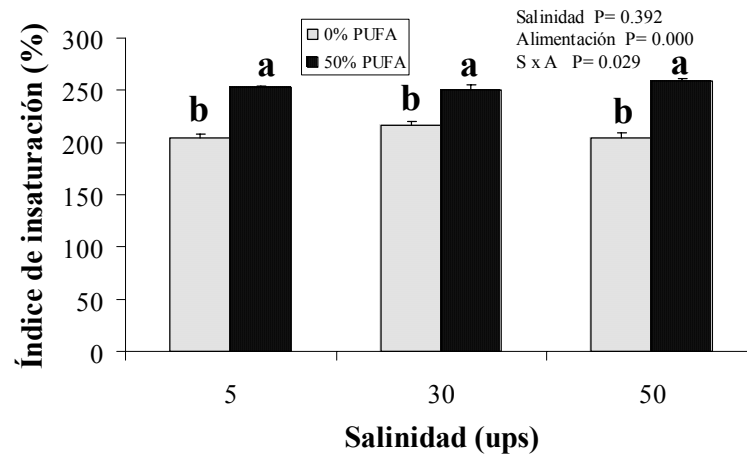


Fig. 20 Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en branquias.

2. SEGUNDO ESTUDIO (*Exposición a estrés crónico*)

2.1 Temperatura y Oxígeno

La temperatura promedio del agua en el total de acuarios utilizados en este estudio se mantuvo en los $25.4 (\pm 0.6) ^\circ\text{C}$, con una tendencia a disminuir hacia el final del experimento (Fig. 21).

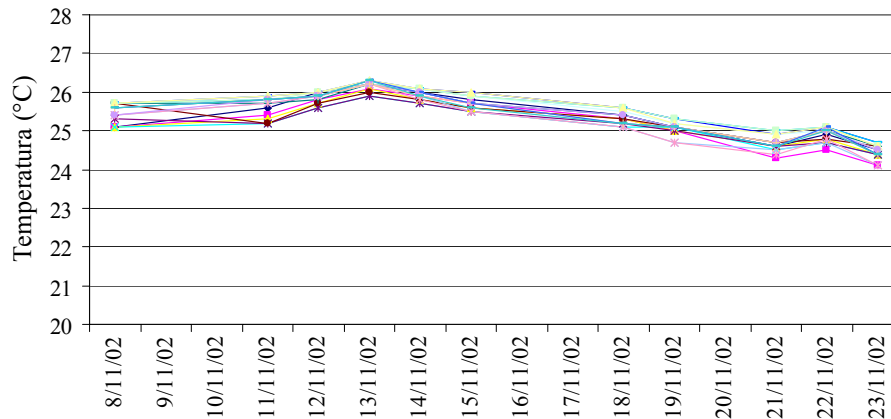


Fig.21 Temperatura ($^\circ\text{C}$) del agua en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés crónico.

La concentración promedio de oxígeno en el agua fue de $5.92 \pm 0.09 \text{ mg/mL}$, lo que representa valores próximos a la saturación (Fig. 22).

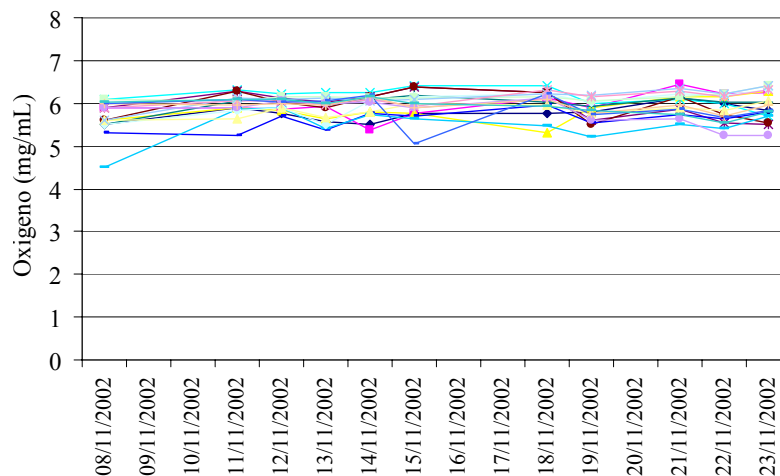


Fig.22 Concentración del oxígeno (mg/mL) en los acuarios durante los 21 días del experimento de estrés crónico.

2.2 Crecimiento, Supervivencia y Factor de Conversión Alimenticio

Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento (%) de los juveniles de camarón con respecto a la salinidad (medias globales = 59.5, 66.3 y 40% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.01$). En este sentido, el crecimiento fue considerablemente menor (40%) en los organismos cultivados a 50 ups. Con respecto a la alimentación y la interacción no se observaron diferencias significativas, aunque si hubo una tendencia en relación a la alimentación, con menor % de crecimiento para los organismos alimentados con la dieta de 0% PUFA (49.7 vs. 60.8% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P = 0.068$), principalmente en los cultivados a 50 ups (Fig. 23).

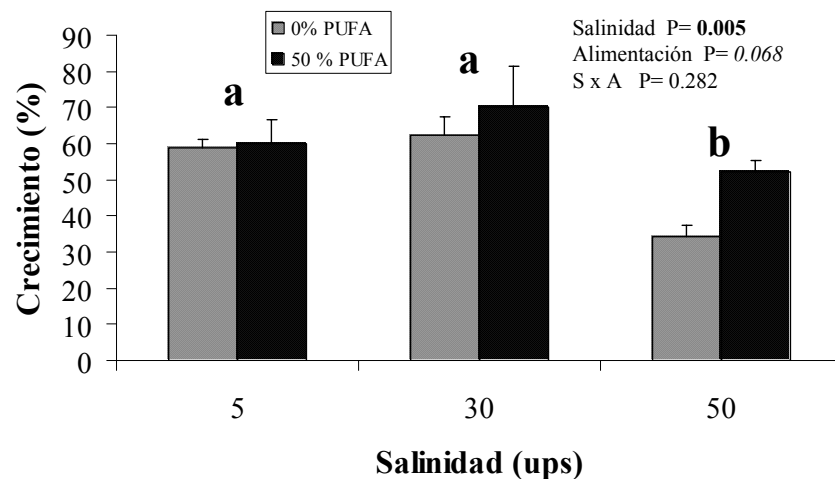


Fig. 23 Crecimiento en peso (%) de los juveniles de camarón expuestos a estrés salino crónico (0, 30 y 50 ups) y alimentados con dos alimentos enriquecidos con PUFA (0 y 50 %). Los resultados del ANOVA se muestran en la figura.

El porcentaje de supervivencia fue estadísticamente mayor en los organismos que fueron cultivados a 5 ups con respecto al obtenido en los organismos control (30 ups), mientras que el registrado en los organismos cultivados a 50 ups no fue estadísticamente diferente al control (Fig. 24). En términos generales, se observó un alto porcentaje de

supervivencia, encontrándose diferencias significativas con respecto a la salinidad (medias globales = 73, 94 y 88% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.005$). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas para alimentación y la interacción.

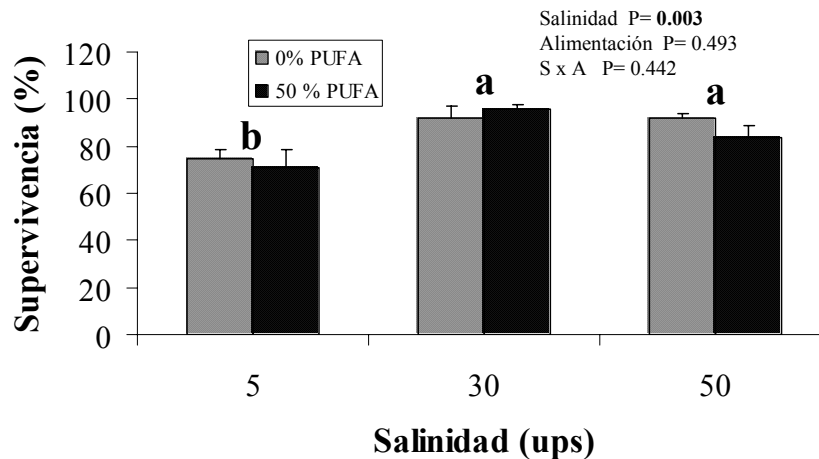


Fig. 24 Supervivencia (%) de los juveniles de camarón expuestos a estrés salino crónico (0, 30 y 50 ups) y alimentados con dos alimentos enriquecidos con PUFA (0 y 50 %). Los resultados del ANOVA se muestran en la figura.

Se encontraron diferencias significativas en el factor de conversión alimenticio (FCA) con respecto a la salinidad, con valores más bajos para el grupo control (1.3 ± 0.1) que para los grupos de organismos cultivados a 5 ups (1.7 ± 0.1) y 50 ups (1.6 ± 0.1). Aunque no hubo una influencia significativa de la alimentación, la interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) sí resultó significativa (Fig. 25). Esto se debió a que la influencia de los PUFA dependió de la salinidad: a 5 y 30 ups el FCA es ligeramente mayor con 50% PUFA, mientras que a 50 ups se observó lo contrario, es decir un menor FCA con el alimento de 50% PUFA.

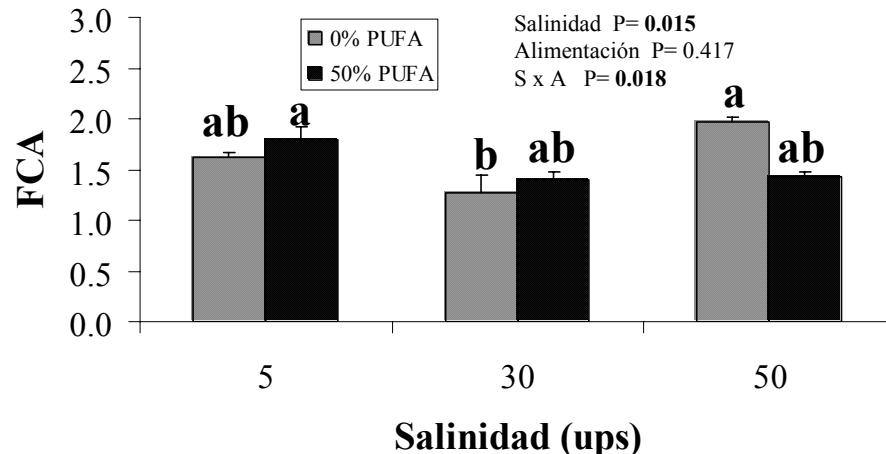


Fig. 25 Factor de conversión alimenticio (FCA) de los juveniles de camarón expuestos a estrés salino crónico (5, 30 y 50 ups) y alimentados con dos alimentos enriquecidos con PUFA (0 y 50 %). Los resultados del ANOVA se muestran en la figura.

2.3 Análisis Bioquímicos

Los resultados de la composición bioquímica en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas se muestran en las Tablas X a XII.

2.3.1 Hemolinfa

En el experimento de estrés crónico, y a diferencia del agudo, sólo se realizó el análisis de presión osmótica, lactato y glucosa en hemolinfa limitación en la cantidad de muestra. Se encontraron diferencias significativas en la presión osmótica (medias globales = 645, 713 y 814 mmol/kg para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.001$) de los organismos expuestos a distintas salinidades, observándose que ésta incrementó conforme aumentó la salinidad de aclimatación (Tabla X). Con respecto a la alimentación e interacción de factores (salinidad vs. alimentación) las diferencias no fueron significativas (Tabla X).

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de lactato con respecto a la salinidad y alimentación, mientras que la interacción entre estos factores sí resultó significativa (Tabla X). Los organismos que fueron cultivados a 30 ups y alimentados con el alimento de 0% PUFA, tuvieron una mayor concentración de lactato que los organismos cultivados en las otras dos salinidades, mientras que con el alimento de 50% PUFA la concentración de lactato fue menor a 30 ups.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de glucosa con respecto a la salinidad o alimentación (Tabla X), pero la interacción entre factores fue significativa ($P < 0.05$). La concentración de glucosa en los organismos que fueron alimentados con el alimento de 0% PUFA y cultivados a 5 ups tiende a ser menor (29.5 ± 10.2 mg/mL) en relación con los organismos alimentados con 50% PUFA y cultivados a 5 ups (59.6 ± 6.2 mg/mL). Sin embargo, a 30 ups la concentración de glucosa es mayor con 0% PUFA que con 50% PUFA.

Tabla X. Presión osmótica y análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en hemolinfa de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Presión osmótica (mmol/kg)	638 \pm 11	713 \pm 12	809 \pm 13	652 \pm 17	713 \pm 10	818 \pm 15	0.000	0.484	0.865
Lactato (mg/dL)	10.2 \pm 1.1 ^{ab}	16.0 \pm 1.5 ^a	12.6 \pm 1.7 ^{ab}	13.7 \pm 1.7 ^{ab}	10.1 \pm 1.1 ^b	13.2 \pm 1.1 ^{ab}	0.708	0.607	0.005
Glucosa (mg/dL)	29.5 \pm 10.2	49.9 \pm 7.5	55.9 \pm 6.7	59.6 \pm 6.2	39.8 \pm 5.3	53.6 \pm 5.9	0.215	0.302	0.022

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las medias con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

2.3.2 Músculo

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de humedad en el tejido muscular con respecto a la salinidad, los cuales fueron mayores a 5 ups que a las otras dos salinidades (medias globales = 79, 77 y 77% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.01$).

Con respecto a la alimentación o la interacción de factores las diferencias no fueron significativas (Tabla XI).

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas con respecto a la salinidad, alimentación e interacción entre factores (salinidad vs. alimentación). Sin embargo, la concentración proteínas tiende a ser mayor en los organismos alimentados con 50% PUFA (medias globales = 918.2 vs. 943.2 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P=0.079$) (Tabla XI).

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de carbohidratos con respecto a la alimentación (medias globales = 47.1 vs. 35.5 mg/g para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P<0.001$), no así con respecto a la salinidad o la interacción entre factores (Tabla XI).

Tabla XI. Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en músculo de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Humedad (%)	78.2 \pm 0.4	77.0 \pm 0.3	77.7 \pm 0.5	78.8 \pm 0.4	77.3 \pm 0.5	76.5 \pm 0.4	0.005	0.773	0.103
Proteína* (mg/g)	921 \pm 22	926 \pm 29	906 \pm 14	994 \pm 16	932 \pm 19	919 \pm 14	0.130	0.079	0.246
Carbohidratos* (mg/g)	50.6 \pm 3.4	47.2 \pm 3.3	43.2 \pm 3.7	40.8 \pm 4.17	32.9 \pm 2.6	34.6 \pm 4.0	0.151	0.000	0.674

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las letras indican las diferencias. *Valores en peso seco.

2.3.3 Hepatopáncreas

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de humedad en hepatopáncreas en relación a la alimentación (medias globales = 72 vs. 75% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P<0.01$) (Tabla XII), no así con respecto a la salinidad, la cual sin embargo, presentó una tendencia a ser significativa, disminuyendo a 50 ups (medias globales

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

= 74, 74 y 72% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P=0.069$). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no resultó significativa.

No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas con respecto a la salinidad, la alimentación e interacción entre factores (Tabla XII).

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de carbohidratos con respecto a la salinidad, con valores más altos a 50 ups (medias globales = 79.4, 75.8 y 104.5 mg/g para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P<0.001$). Aunque no hubo un efecto significativo de la alimentación, la interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) sí resultó significativa ($P<0.001$). Esto se debió a que el efecto de la salinidad (mayor concentración de carbohidratos a 50 ups) fue más acentuado con el alimento de 0% PUFA que con 50% PUFA (Tabla XII).

La concentración de carotenoides varió significativamente en relación a la alimentación (medias globales = 564.7 y 652.7 $\mu\text{g/g}$ para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P=0.05$), no así con respecto a la salinidad o interacción entre factores (salinidad vs. alimentación).

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos con respecto a la salinidad (medias globales = 39.7, 47.4 y 54.8 mg/g para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P<0.01$), no así en relación con la alimentación, aunque esta mostró cierta tendencia a ser mayor a 50 ups (medias globales = 43.3 y 50.4 mg/g para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P=0.070$). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no resultó significativa (Tabla XII).

Tabla XII. Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en hepatopáncreas de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Humedad (%)	72.6 \pm 0.6	72.3 \pm 1.0	71.6 \pm 1.4	76.8 \pm 1.1	75.5 \pm 0.7	72.7 \pm 1.3	0.069	0.002	0.363
Proteínas* (mg/g)	148 \pm 9	155 \pm 7	183 \pm 11	160 \pm 14	169 \pm 8	158 \pm 12	0.303	0.972	0.096
Carbohidratos* (mg/g)	76 \pm 3 ^{bc}	68 \pm 3 ^c	114 \pm 7 ^a	85 \pm 7 ^{bc}	84 \pm 3 ^{bc}	93 \pm 5 ^b	0.000	0.707	0.000
Carotenoides* (μ g/g)	551 \pm 28	563 \pm 35	581 \pm 35	606.3 \pm 51	707.3 \pm 50	619.4 \pm 62	0.433	0.031	0.406
Triglicéridos* (mg/g)	42.5 \pm 3.0	52.7 \pm 5.3	55.6 \pm 4.2	35.4 \pm 4.1	42.0 \pm 2.5	53.8 \pm 5.8	0.004	0.070	0.566

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las letras indican las diferencias. *Valores en peso seco.

2.3.4 Branquias

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de humedad con respecto a la salinidad, tanto en branquias anteriores (medias globales 84, 83 y 82.0% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.01$) como posteriores (medias globales = 86, 86 y 82% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P = 0.001$), donde se observa que a mayor salinidad, menor cantidad de agua. En branquias anteriores y posteriores no se encontraron diferencias significativas con respecto a la alimentación. El porcentaje de humedad las branquias posteriores no varió significativamente por la interacción de factores, pero sí se observó una tendencia a ser significativa en las branquias anteriores ($P = 0.061$) (Tabla XIII), puesto que con 0% PUFA el mayor % de humedad fue a la salinidad de 5 ups, mientras que con 50% PUFA, el menor porcentaje de humedad fue a la salinidad de 50 ups.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas tanto de branquias anteriores como posteriores con respecto a la salinidad, alimentación e interacción de factores, pero se observó una tendencia en branquias posteriores ($P = 0.084$). Aunque no se realizaron análisis estadísticos entre las posiciones de las branquias, se aprecia que la concentración de proteínas es mayor en las branquias posteriores (Tabla XIII).

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Se encontraron diferencias significativas en la actividad total de la ATPasa (medias globales = 12.0, 8.5 y 7.7 $\mu\text{MPi g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para 0, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$) en branquias anteriores con respecto a la salinidad, mientras que en relación a la alimentación o la interacción entre factores (salinidad v.s alimentación) las diferencias no son significativas. La mayor actividad total de la Na^+/K^+ ATPasa se encontró en las branquias de los organismos que fueron cultivados a 5 ups y está fue significativamente diferente, de la actividad encontrada a 30 y 50 ups (Tabla XIII).

No se encontraron diferencias significativas en la actividad total de la ATPasa en branquias posteriores con respecto a la salinidad, alimentación e interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) (Tabla XII).

No se encontraron diferencias significativas en la actividad específica de la Na^+/K^+ ATPasa ni en branquias anteriores ni en posteriores con respecto a la salinidad o alimentación, así como tampoco en la interacción entre estos factores. Si bien no se realizaron análisis estadísticos entre la posición de las branquias, y a semejanza de lo que se observó para la actividad total, se encontró que la actividad específica de la Na^+/K^+ ATPasa fue mayor en las branquias anteriores que en las posteriores (Tabla XIII).

Tabla XIII. Análisis bioquímicos (media \pm E.E.) en branquias anteriores (a) y posteriores (p) de los organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

		0 % PUFA			50 % PUFA			S	A	S x A
		5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
Humedad (%)	a	84.1 \pm 0.3	82.3 \pm 0.5	81.7 \pm 0.3	83.1 \pm 0.6	83.6 \pm 0.3	82.4 \pm 0.8	0.008	0.396	0.061
	p	85.0 \pm 0.9	85.5 \pm 0.7	81.3 \pm 1.8	86.8 \pm 1.6	85.5 \pm 1.0	82.1 \pm 0.7	0.001	0.387	0.749
Proteínas* (mg/g)	a	121.8 \pm 13.2	123.3 \pm 9.7	120.1 \pm 9.6	132.6 \pm 10.4	129.7 \pm 7.7	124.8 \pm 8.7	0.888	0.394	0.959
	p	149.1 \pm 7.1	154.5 \pm 6.1	160.7 \pm 4.9	161.5 \pm 5.3	149.9 \pm 4.4	146.8 \pm 4.4	0.860	0.660	0.084
Actividad total* ($\mu\text{MPi g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	a	11.04 \pm 1.83	9.93 \pm 1.24	6.87 \pm 1.04	12.92 \pm 1.26	7.16 \pm 1.19	8.55 \pm 1.90	0.017	0.830	0.186
	p	10.67 \pm 1.83	6.34 \pm 1.47	7.43 \pm 0.96	7.47 \pm 2.16	8.33 \pm 1.54	5.33 \pm 1.01	0.240	0.381	0.193
Actividad específica ($\mu\text{MPi mg}^{-1} \text{prot.}$)	a	0.11 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.357	0.376	0.257
	p	0.08 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.199	0.302	0.114

Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las tres últimas columnas (S = salinidad, con tres niveles 5, 30 y 50 ups; A = alimento, con dos niveles, 0% y 50% de PUFA; S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar las medias; las letras indican las diferencias. *Valores en peso seco.

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

2.4 Composición de ácidos grasos en branquias y hepatopáncreas.

La composición de los principales ácidos grasos de las fracciones neutra y polar del tejido branquial y de hepatopáncreas de este experimento se muestra en las Figuras 26 a 41, así como el resto de ellos en el ANEXO F. Al igual que en el experimento de estrés agudo, en la sección de resultados sólo se consideraron y graficaron (media \pm error estándar) las posibles variaciones en el porcentaje molar de los principales ácidos grasos altamente insaturados (HUFA): el 20:4(n-6) (araquidónico), el 20:5(n-3) (eicosapentaenoico) y el 22:6(n-3) (docosahexaenoico); así como el índice de insaturación.

2.4.1 Hepatopáncreas: Fracción Neutra.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso araquidónico en la fracción neutra en hepatopáncreas con respecto a la salinidad o alimentación. La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) resultó significativa, dado que el porcentaje de 20:4(n-6) fue menor a 30 y 50 ups, en comparación a 5 ups y únicamente con la dieta de 0% PUFA, mientras que este efecto no se observó con la dieta de 50% PUFA (Fig. 26).

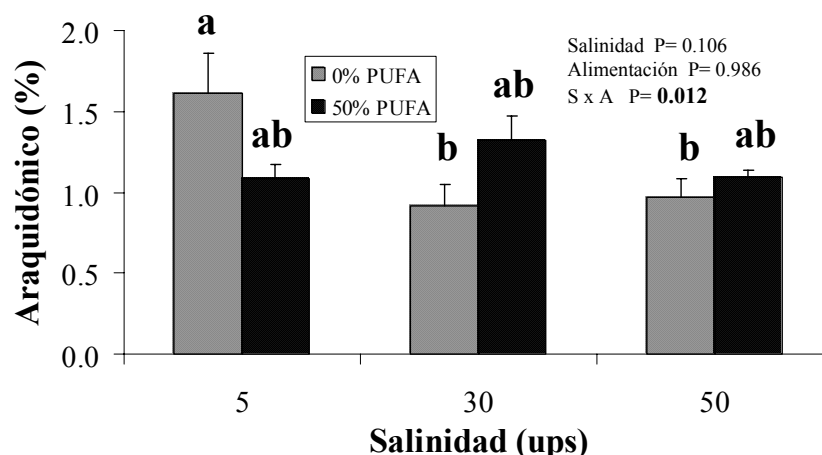


Fig. 26 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso eicosapentaenoico en la fracción neutra en hepatopáncreas con respecto a la salinidad (medias globales = 7.5, 6.4 y 6.1% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.01$) y alimentación (medias globales = 2.9 y 10.4% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no resultó significativa ($P = 0.077$) aunque sí presentó una tendencia. El efecto de la salinidad (menor porcentaje a mayor salinidad) se observó principalmente en el alimento de 0% PUFA (Fig. 27).

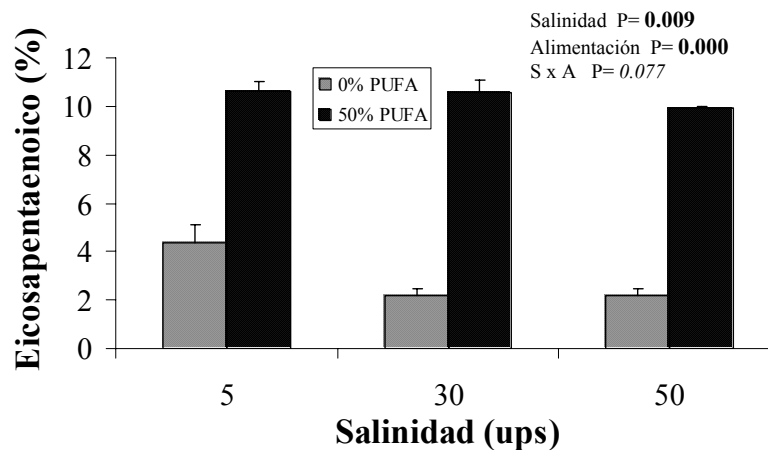


Fig. 27 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso docosahexaenoico en la fracción neutra en hepatopáncreas con respecto a la salinidad (medias globales = 7.8, 8.6 y 7.4% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$), alimentación (medias globales = 3.2 y 12.7% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) e interacción de factores (salinidad vs. alimentación) ($P < 0.001$). El porcentaje de este ácido graso fue mucho mayor en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA, y el cual disminuyó significativamente a 5 ups ($11.5 \pm 0.4\%$) y no a 50

ups ($12.5 \pm 0.3\%$) con respecto al control a 30 ups ($14.1 \pm 0.3\%$). En contraste, en los organismos que fueron alimentados con el alimento de 0% PUFA se encontró una ligera disminución gradual del porcentaje molar del 22:6(n-3) con respecto al aumento en la salinidad (Fig. 28).

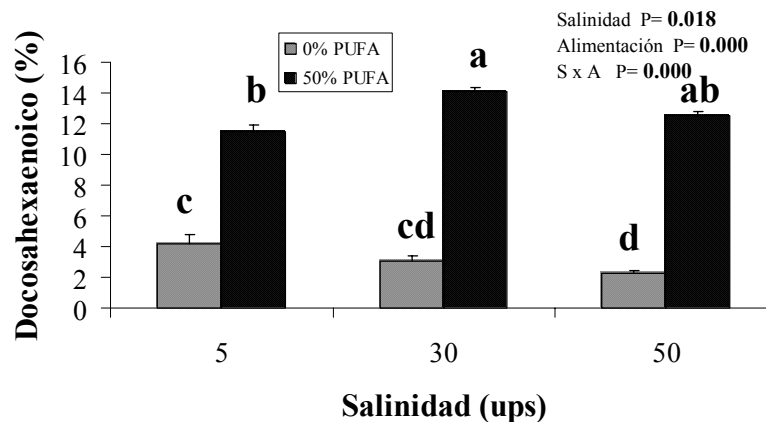


Fig. 28 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias significativas en el índice de insaturación en la fracción neutra en hepatopáncreas con respecto a la salinidad (medias globales = 188, 184 y 176 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$), alimentación (medias globales = 135 vs. 230 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) e interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) ($P < 0.001$). El índice de insaturación fue mayor en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA y no hubo diferencias significativas entre salinidades. Sin embargo, en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 0% PUFA el índice de insaturación a 5 ups ($149 \pm 7\%$) fue estadísticamente diferente de los encontrados a 30 ($130 \pm 4\%$) y 50 ups ($126 \pm 2\%$) (Fig. 29).

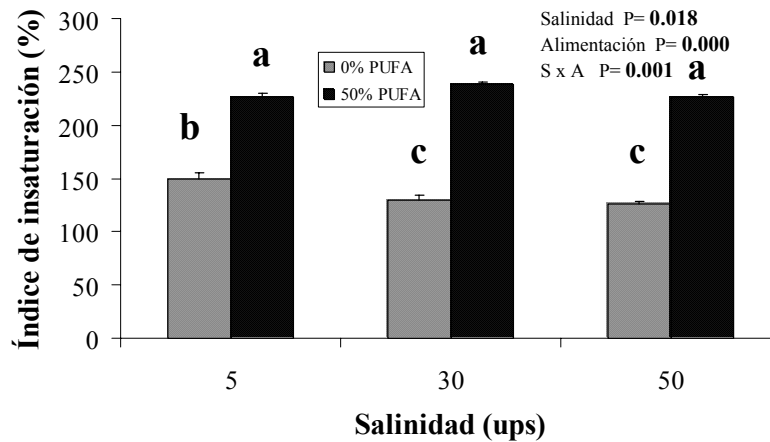


Fig. 29 Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en hepatopáncreas.

2.4.2 Hepatopáncreas: Fracción polar

No se encontraron diferencias en el porcentaje molar del ácido graso araquidónico en la fracción polar en hepatopáncreas con respecto a la salinidad, mientras que con respecto a la alimentación las diferencias encontradas sí son significativas (medias globales = 3.9 vs. 3.2 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no fue significativa (Fig. 30).

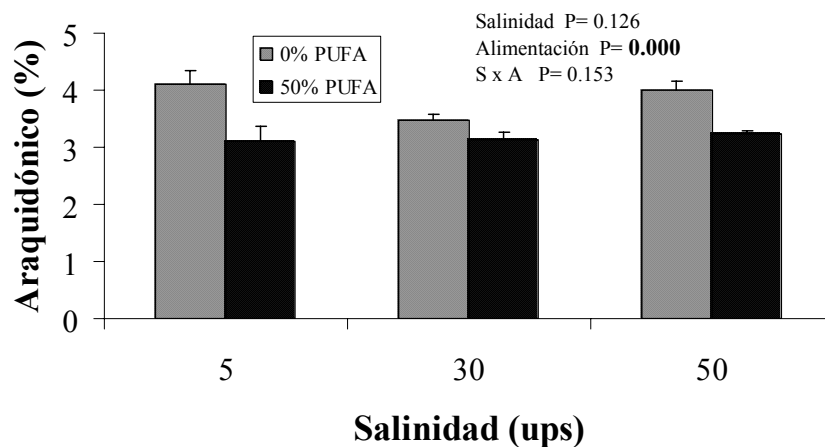


Fig. 30 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas.

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso eicosapentaenoico en la fracción polar en los hepatopáncreas con respecto a la salinidad (medias globales = 17.6, 15.5 y 15.6% para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.001$) y alimentación (medias globales = 9.9 y 23.6% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$), mientras que la interacción entre factores no resultó significativa (Fig. 31).

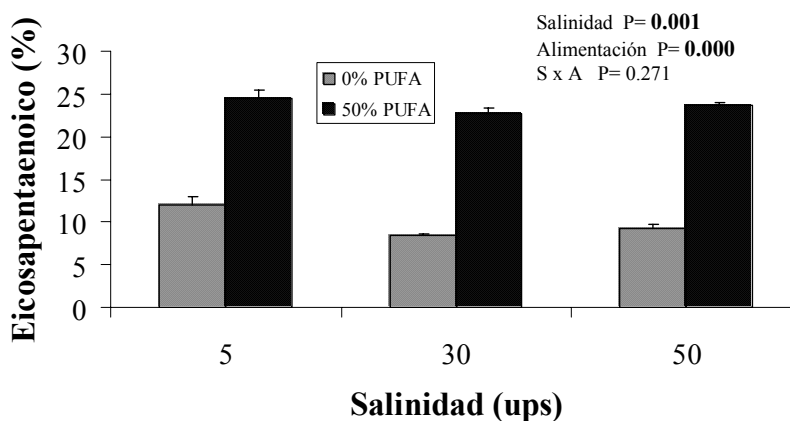


Fig. 31 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas.

En el porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción polar en hepatopáncreas no se encontraron diferencias significativas con respecto a la salinidad ($P=0.076$), pero sí con respecto a la alimentación (medias globales = 9.1 vs. 20.3% para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) y en la interacción entre factores ($P < 0.001$) (Fig. 32). En los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA, el porcentaje de 22:6(n-3) fue menor a 5 ups ($18.6 \pm 0.3\%$) que a 30 ups ($21.6 \pm 0.6\%$), con valores intermedios para la salinidad de 50 ups ($20.8 \pm 0.4\%$); contrariamente en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 0% PUFA el porcentaje molar del

22:6(n-3) fue significativamente mayor a 5 ups ($10.7 \pm 0.7\%$) con respecto a 50 ups ($7.4 \pm 0.5\%$), con valores intermedios para el grupo control a 30 ups ($9.1 \pm 0.4\%$) (Fig. 32).

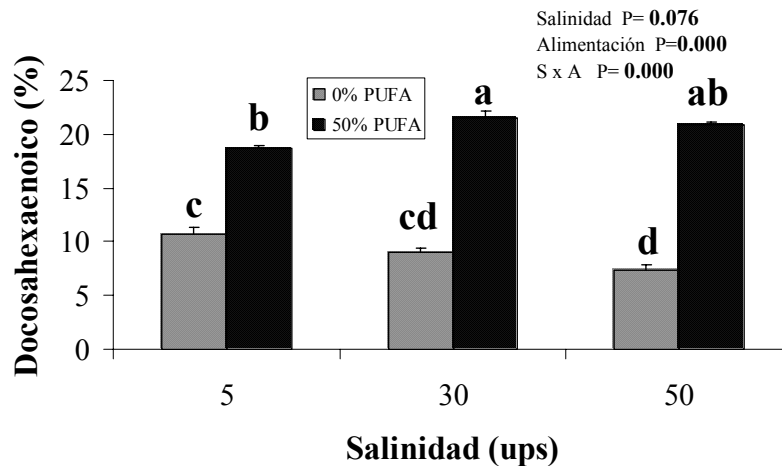


Fig. 32 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas

No se encontraron diferencias significativas en el índice de insaturación de la fracción polar en hepatopáncreas con respecto a la salinidad, mientras que en relación con la alimentación (medias globales = 219 vs. 316 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) e interacción de factores las diferencias encontradas son significativas (Fig. 33). El mayor índice de insaturación se encontró en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA, en los cuales no se observaron diferencias significativas cuando se compararon las medias por análisis de Tukey. Por otro lado, con el alimento de 0% PUFA, se encontraron los valores significativamente más altos en los organismos cultivados a 5 ups (Fig. 33).

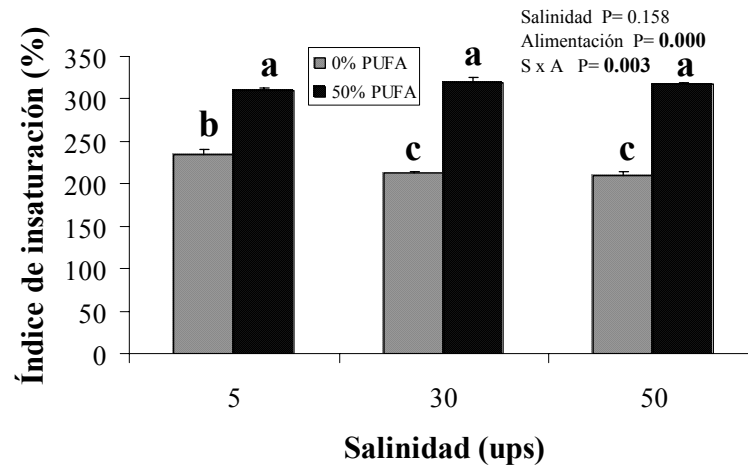


Fig. 33 Índice de saturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en hepatopáncreas.

2.4.3. Branquias: Fracción neutra

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción neutra en las branquias con respecto a la salinidad, e interacción entre factores (salinidad vs. alimentación), pero sí con respecto a la alimentación (medias globales = 5.8 vs. 5.1 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.05$) (Fig. 34).

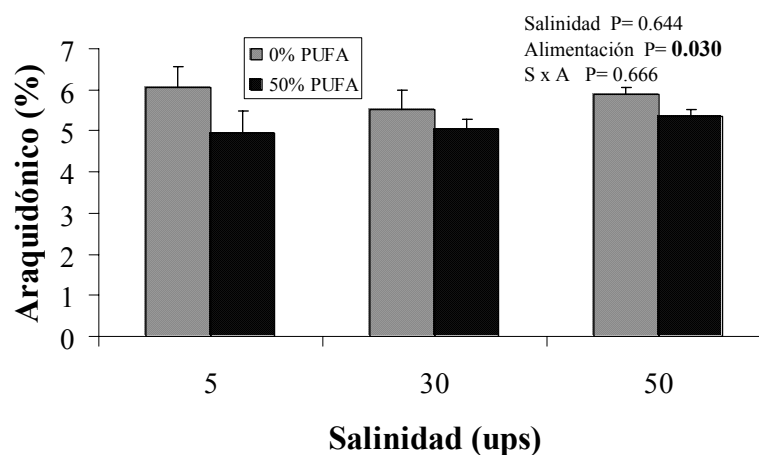


Fig. 34 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción neutra en branquias con respecto a la salinidad, pero con respecto a la alimentación las diferencias encontradas son significativas (medias globales = 18.3 vs. 25.5 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig. 35). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no fue significativa.

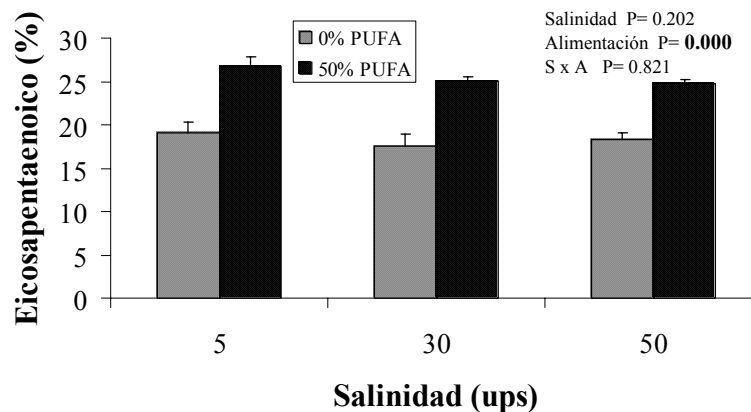


Fig. 35 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción neutra en branquias con respecto a la salinidad, mientras que en relación con la alimentación las diferencias son significativas (medias globales = 11.4 vs. 16.0 para 0 y 50%, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig. 36). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no fue significativa.

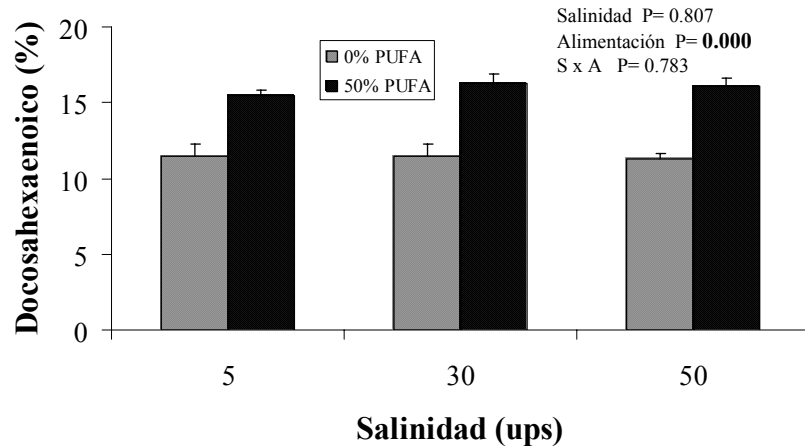


Fig. 36 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en el índice de insaturación en la fracción neutra en branquias con respecto a la salinidad, mientras que con respecto a la alimentación las diferencias son significativas (medias globales = 261.1 vs. 306.0 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig. 37). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no resultó significativa.

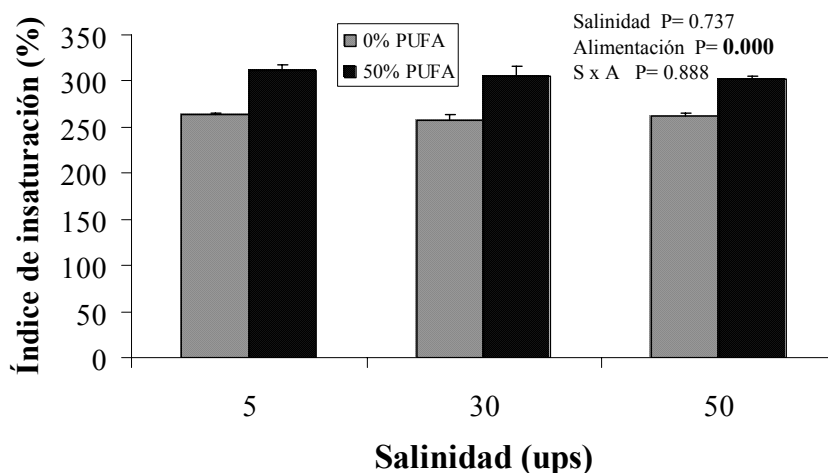


Fig. 37 Índice de insaturación (% molar) en la fracción de lípidos neutros en branquias.

2.4.4 Branquias: Fracción polar

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción polar en branquias con respecto a la salinidad (medias globales = 3.9, 3.6 y 4.0 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$), así como en la interacción de factores; mientras que en relación a la alimentación las diferencias no son significativas. El porcentaje molar de este ácido graso no varió significativamente en relación con la salinidad en los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA, mientras que con 0% PUFA, los organismos cultivados a 30 ups presentaron menor nivel ($3.2 \pm 0.1\%$) de 20:4(n-6) que aquellos cultivados a 5 ups ($4.2 \pm 0.2\%$) y 50 ups ($3.9 \pm 0.2\%$) (Fig. 38).

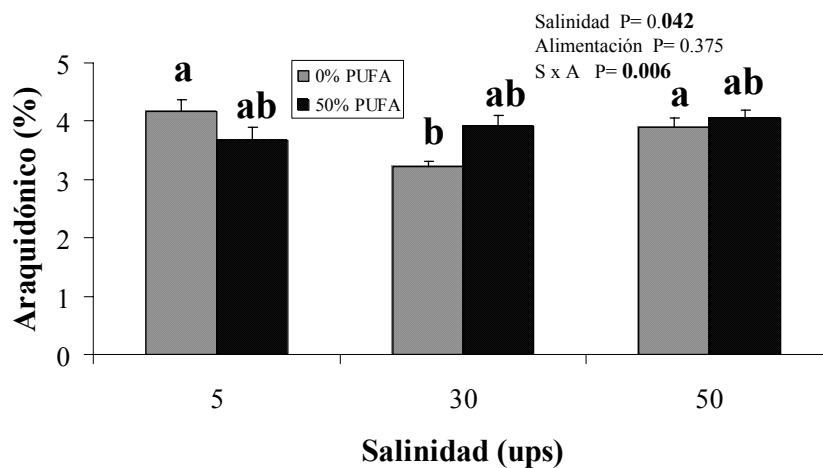


Fig. 38 Porcentaje molar del ácido graso 20:4(n-6) en la fracción de lípidos polares en branquias.

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción polar en branquias con respecto a la salinidad, con valores más altos a 5 ups (medias globales = 18.4, 16.3 y 16.9 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.001$), la alimentación también influyó significativamente (medias globales = 12.6 vs. 21.8% para 0 y

50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$), mientras que la interacción no resultó significativa (Fig.39).

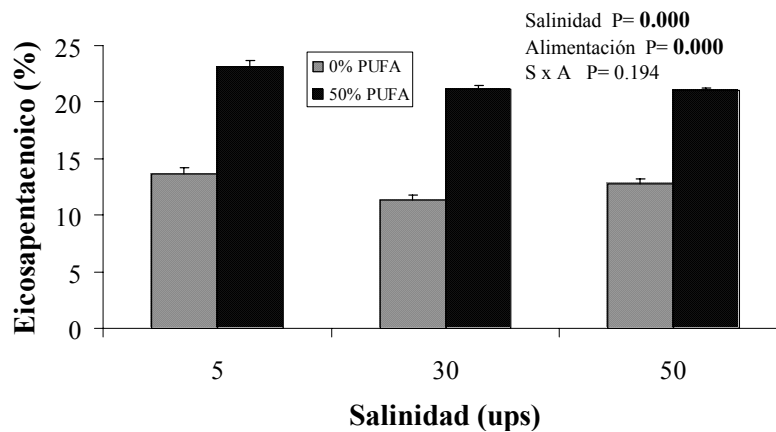


Fig. 39 Porcentaje molar del ácido graso 20:5(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción polar en branquias con respecto a la salinidad, mientras que en relación con la alimentación las diferencias son significativas (medias globales = 8.6 vs. 15.5 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig.40). La interacción entre factores (salinidad vs. alimentación) no resultó significativa.

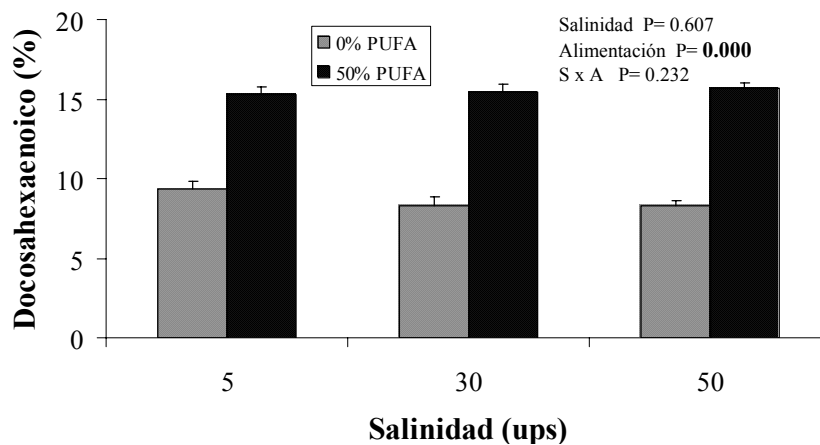


Fig. 40 Porcentaje molar del ácido graso 22:6(n-3) en la fracción de lípidos polares en branquias.

Se encontraron diferencias significativas en el índice de insaturación de la fracción polar en branquias con respecto a la salinidad con valores significativamente más altos a 50 ups que a la salinidad control (medias globales = 244.1, 233.8 y 237.8 para 5, 30 y 50 ups, respectivamente; $P < 0.05$), la alimentación también influyó significativamente (medias globales = 206.7 vs. 270.4 para 0 y 50% PUFA, respectivamente; $P < 0.001$) (Fig.41), mientras que la interacción entre factores no resultó significativa.

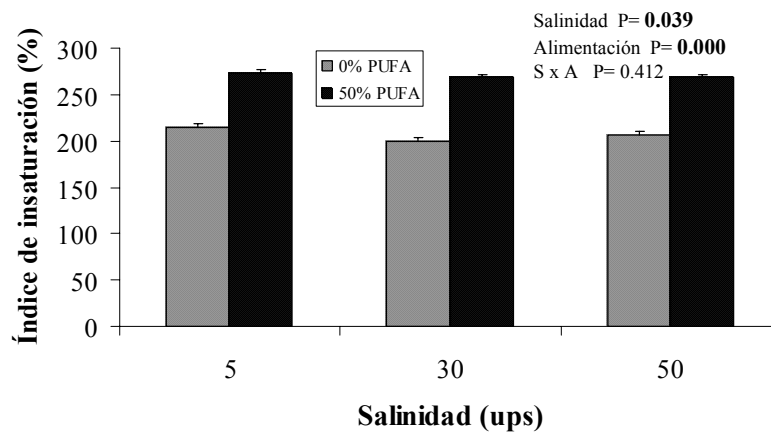


Fig. 41 Índice de saturación (% molar) en la fracción de lípidos polares en branquias.

IX. DISCUSIÓN

Los factores fisicoquímicos del agua, como el oxígeno disuelto y la temperatura en ambos experimentos se mantuvieron constantes y similares entre ellos. La concentración de oxígeno del agua en ambos experimentos se mantuvo en valores cercanos a la saturación (5.9 mg/mL), mientras que la temperatura del agua de los acuarios se mantuvo en promedio a $25.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$, la cual disminuyó ligeramente 1°C hacia el final de ambos experimentos. Esto se debió a que la temperatura del agua de los acuarios estaba controlada por el ambiente de una sala de maduración de camarones. Las condiciones de este lugar permitieron un mayor control de la temperatura ambiental, calidad del agua, intensidad y cantidad de luz, facilidad en las rutinas de limpieza, etc. Los parámetros de la calidad del agua se mantuvieron durante ambos experimentos dentro de los intervalos recomendados para el cultivo comercial de esta especie (Samocha *et al.*, 1993). Como consecuencia, no se esperan cambios importantes en el crecimiento, supervivencia y las variables bioquímicas de los organismos en respuesta a estos factores fisicoquímicos del agua.

A. EFECTO DEL ALIMENTO

SUPERVIVENCIA, CRECIMIENTO Y FACTOR DE CONVERSIÓN ALIMENTICIO.

En ninguno de los dos experimentos el enriquecimiento del alimento con PUFA influyó significativamente en la supervivencia de los juveniles de camarón, sin embargo en el experimento agudo la supervivencia fue ligeramente mayor en los organismos alimentados con la dieta de 50% PUFA (17 vs. 20%; para 0 y 50% PUFA).

En varios trabajos se ha demostrado en postlarvas que el suministro de alimentos ricos en PUFA aumenta el porcentaje de supervivencia en cultivo (Durán-Gómez *et al.*, 1991; Rees *et al.*, 1994; Wouters *et al.*, 1997; Coutteau *et al.*, 1997; Kontara *et al.*, 1997). Al igual que en postlarvas, trabajos recientes en juveniles han demostrado significativos aumentos de peso y buenos porcentajes de supervivencia en camarón blanco *L. vannamei* (González-Félix *et al.*, 2002a, 2002b). Rees *et al.* (1994) propusieron que un incremento en la supervivencia en organismos alimentados con altos niveles de PUFA se debía a un aumento en la condición fisiológica general de los organismos, particularmente de reservas. La falta de efecto de los PUFA en este trabajo podría deberse a que la duración de los bioensayos (3 semanas) haya resultado insuficiente para observar algún efecto. Otra posibilidad es que los organismos estuvieran en condiciones óptimas durante el cultivo, aún en las condiciones de hipo o hipersalinidad del experimento de estrés crónico, en contraste con otros trabajos donde el valor de los PUFA se aprecia en condiciones más adversas de estrés ambiental (Kanazawa, 1997; Chim *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2004a).

En ninguno de los dos experimentos se encontraron diferencias significativas de crecimiento con respecto a la alimentación con distintos niveles de PUFA. Sin embargo, en el experimento de estrés crónico se observó una tendencia ($P=0.068$) en respuesta a la alimentación, dado que se observó que los organismos que fueron alimentados con la dieta de 50% PUFA mostraron una tendencia a ganar más peso que los alimentados con el alimento de 0% PUFA (61 vs. 49%, respectivamente). Aunado a esto, se observó un mayor FCA en los organismos alimentados con 0% PUFA y cultivados a 50 ups (Fig. 25). En estudios previos se ha descrito que alimentos con altas cantidades de PUFA favorecen el crecimiento de camarones peneidos (Bautista y Subosa, 1997; Lim *et al.*, 1997; González-Félix *et al.*, 2002a, 2002b). Sin embargo, en el estudio realizado por Lim *et al.* (1997), en el que se observó un efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

incremento en el crecimiento de juveniles de *L. vannamei* alimentados con PUFA, tuvo una duración de 10 semanas, a diferencia del presente experimento que duro 21 días. Por lo tanto, al igual que la supervivencia, es posible que la prolongación de los experimentos de estrés agudo y crónico tuvieron un efecto significativo en el crecimiento en relación a la alimentación con distintos niveles de PUFA. Por otro lado, en postlarvas de *Penaeus monodon*, Rees *et al.* (1994) no observaron un incremento en el crecimiento de organismos alimentados con altos niveles de PUFA. Es necesario puntualizar que su experimento tuvo una duración de 10 días y no se realizaron correcciones de densidad en relación a la supervivencia, lo cual probablemente afectó el crecimiento, ya que se trató de postlarvas en las cuales la tasa de crecimiento es muy diferente. En el presente trabajo, los organismos muertos fueron sustituidos constantemente por organismos que no fueron usados para las determinaciones bioquímicas, con el propósito de mantener la densidad constante y eliminar este factor sobre el crecimiento.

El factor de conversión alimenticio (FCA) en el experimento de estrés agudo resultó particularmente grande, debido principalmente a que el incremento en la biomasa por unidad experimental fue relativamente bajo (0.6 g en promedio por tara). Este relativo y bajo incremento o ganancia de peso, reflejó poca eficiencia del alimento suministrado.

RESPUESTA AL ESTRÉS: LACTATO Y GLUCOSA

Recientemente se han utilizado una gran variedad de parámetros bioquímicos en hemolinfa para evaluar y monitorear las condiciones fisiológicas de algunas especies de camarones, tanto del medio natural como bajo condiciones de cultivo. Entre estos parámetros se encuentran el lactato, la glucosa, las proteínas y la hemocianina, los cuales han resultado

ser buenos indicadores en la evaluación del estrés. De estos, el lactato y particularmente la glucosa se han descrito como los mejores indicadores en el estrés producido por la extracción repetida de muestras de hemolinfa y inyección de serotonina (Racotta y Palacios, 1998), la transferencia a condiciones de laboratorio (Sánchez *et al.*, 2001) y las diferencias entre organismos cultivados en estanques interiores vs. exteriores (Pascual *et al.*, 2003). Estos mismos parámetros resultaron útiles para evaluar el efecto de la alimentación en el estrés salino al cual fueron sujetos los organismos del experimento de estrés agudo.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de glucosa en ambos experimentos con relación a la exposición a baja y alta salinidad, pero la concentración de glucosa en hemolinfa está dentro del intervalo de valores que otros autores describen para organismos relativamente estresados (de 24.8 a 58.2 mg/dL para el experimento de estrés agudo y de 29.5 a 59.6 mg/dL para el experimento de estrés crónico). Pascual *et al.* (2003) mencionaron que los valores basales de la glucosa para organismos cultivados de *L. vannamei* en estanques exteriores es 26% mayor (42 ± 16 mg/dL) a los encontrados en los organismos cultivados en estanques interiores (31 ± 15 mg/dL). Racotta y Palacios (1998), así como Carreño *et al.*, (1999) describen valores basales de glucosa de 15 mg/dL y bajo condiciones de estrés por manipulación, los cuales pueden subir a 60 mg/dL. Por lo anterior, es de esperarse que el muestreo de los organismos en esta tesis provocara una respuesta de estrés (hiperglucemia) que disfrazara la posible respuesta de estrés producido por un cambio abrupto de salinidad.

Sin embargo, la alimentación influyó significativamente en el estrés causado por los cambios abruptos de la salinidad o por la manipulación durante el muestreo en el caso del lactato, ya que la menor concentración de este metabolito se encontró en los organismos que

fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA (9.1 mg/dL) en comparación de los alimentados con 0% PUFA (11.7 mg/dL; $P < 0.01$). Estos resultados son semejantes en magnitud a los descritos por varios autores en que refieren concentraciones basales de lactato de 15 mg/dL para organismos cultivados bajo condiciones normales, tanto en estanques interiores como exteriores (Pascual *et al.*, 2003). Por otra parte, Racotta y Palacios (1998) describen concentraciones basales de lactato (10 mg/dL) similares y describen que los valores pueden incrementarse hasta 4 veces por la manipulación dentro de los primeros 30 minutos. En contraste, no se observaron efectos significativos sobre la concentración de lactato en hemolinfa en organismos alimentados con distintos niveles de PUFA y expuestos a distintas salinidades en forma crónica. Esto resulta interesante dado que puede implicar que los organismos alimentados con alimentos ricos en PUFA pueden incrementar su resistencia a algún tipo de estrés agudo, sin mostrar diferencias o ventajas de éste tipo de alimentación en tratamientos prolongados. Es probable que la condición fisiológica general de los juveniles alimentados con el alimento de 50% PUFA estuviera por encima de aquellos que se mantuvieron con el alimento de 0% PUFA, confiriéndoles mayores reservas energéticas para soportar el estrés causado en cada uno de los experimentos. En este sentido, se ha demostrado con anterioridad en pruebas de estrés salino que la tolerancia a cambios agudos de salinidad está relacionada con la condición fisiológica de los organismos (Tackaert *et al.*, 1992; Rees *et al.*, 1994; Kontara *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 2004b).

CAPACIDAD OSMORREGULATORIA: PRESIÓN OSMÓTICA

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

No se encontraron diferencias significativas en la presión osmótica en relación con la alimentación para ninguno de los dos experimentos. Estudios previos han demostrado que la capacidad de osmorregulación puede ser modificada hasta cierto punto por la alimentación, como lo demostró Chim *et al.*, (2001) al exponer juveniles de *L. stylirostris* a estrés salino hiposmótico (de 35 a 10 ups), los cuales fueron alimentados con peletizado enriquecido con ácidos grasos altamente poliinsaturados (HUFA) por 28 días. Sin embargo, esta influencia tiene que ser analizada en conjunto con el efecto de la salinidad por lo cual se discutirá más adelante.

COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y ACTIVIDAD $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$

En *Artemia sp.* (Morohashi *et al.*, 1991) y distintos vertebrados (Kimelberg y Papahadjopoulos, 1972; Poon *et al.*, 1981; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2001) se ha descrito el efecto de los ácidos grasos con la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa. Por lo anterior, es necesario analizar de primera instancia si la alimentación tuvo un efecto en la composición de las membranas celulares del tejido branquial y esta a su vez en la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. Por otra parte, como el hepatopáncreas es el principal órgano de síntesis de enzimas digestivas, absorción y almacenamiento de nutrientes, como los son el glucógeno y los lípidos (Brunet *et al.*, 1994), es necesario analizar en qué medida se modificó la composición de ácidos grasos de éste órgano primeramente, y a continuación examinar si ésta modificación ocurre a nivel de tejidos somáticos como los son las branquias.

Como era de esperarse, se encontraron diferencias significativas en relación a la alimentación en el porcentaje molar de los principales ácidos grasos, entre ellos: el eicosapentaenoico (EPA) ó 20:5(n-3), el docosahexaenoico (DHA) ó 22:6(n-3) y en el índice de insaturación, tanto en la fracción neutra como polar en los hepatopáncreas de los organismos expuestos a estrés agudo y crónico. Sin embargo, en el caso del ácido graso araquidónico (20:4(n-6)) no se observaron diferencias significativas, incluso a diferencia de lo que se observó con el EPA, DHA e índice de insaturación, el araquidónico disminuyó en los hepatopáncreas de los organismos alimentados con el alimento de 50% PUFA. A pesar de algunas variaciones particulares de algunos ácidos grasos, se puede observar el efecto de los alimentos suministrados, puesto que el índice de insaturación es significativamente mayor en los hepatopáncreas de los organismos que fueron alimentados con el alimento de 50% PUFA en comparación de los que fueron alimentados con 0% PUFA.

Dado el efecto del alimento sobre la composición de lípidos del hepatopáncreas, el siguiente paso fue evaluar si la composición bioquímica también fue afectada en otros tejidos y órganos, como lo son las branquias. El análisis de la composición de ácidos grasos en las branquias demuestra que la alimentación con 50% PUFA aumentó significativamente ($P < 0.001$) los porcentajes molares de los ácidos grasos 20:5(n-3) y 22:6(n-3), así como en el índice de insaturación tanto de la fracción neutra como polar en ambos experimentos.

Estos resultados nos permiten concluir que el tipo de alimentación y el tiempo de experimentación fueron suficientes para modificar la composición de ácidos grasos en hepatopáncreas y branquias de los organismos utilizados en esta tesis.

B. EFECTO DE LA SALINIDAD

SUPERVIVENCIA, CRECIMIENTO Y FACTOR DE CONVERSIÓN ALIMENTICIA.

En ambos experimentos (estrés agudo vs. crónico) el porcentaje de supervivencia de los organismos en promedio fue mayor al 70%. El cambio de salinidad en el experimento de estrés agudo no tuvo un efecto en la supervivencia, tal y como se esperaba de acuerdo a los resultados preliminares donde se evaluó este efecto, y en el que se establecieron los límites de salinidad para asegurar la supervivencia de los organismos (Tabla V). En el experimento crónico, los menores porcentajes de supervivencia se encontraron a 5 ups y 50 ups, con respecto a 30 ups, indicando un efecto de las condiciones hipo- e hipersalinas a las que fueron expuestos los organismos (Fig. 24). Para entender los efectos de estas condiciones es necesario recordar el comportamiento que tienen los camarones peneidos en el medio natural: los adultos se reproducen y desovan en mar abierto, posteriormente las larvas al irse desarrollando, se acercan a las zonas costeras para ingresar a lagunas y esteros donde permanecen hasta alcanzar el estadio de juvenil donde inicia su migración hacia mar abierto para comenzar nuevamente este ciclo (Dall *et al.*, 1990). Las zonas costeras y principalmente las lagunas y esteros, se caracterizan por ser cuerpos de agua en los que se mezclan aguas dulces provenientes de ríos y arroyos con las aguas saladas de los océanos y bahías (Gross, 1972). Esta característica genera un gradiente salino longitudinal de 0 a 40 ups (0-1200 mmol/kg) (Henry, 2001), desde la cabeza del estero o laguna (zona donde ingresa el agua dulce) hacia la boca, en que las aguas salobres tienen contacto directo con las aguas marinas (Carriker, 1967). Sin embargo las tallas de los organismos utilizados en esta tesis coinciden con las descritas por algunos autores (de 40 a 100 mm y de 80-120 mm; Martínez-Córdova, 1999 y Laubier 1990, respectivamente) en que precisamente los camarones abandonan esteros

y lagunas para iniciar su migración hacia aguas marinas, donde las variaciones en salinidad son mínimas o casi nulas en relación a las que se pueden presentar en esteros y lagunas. Por lo tanto, se puede inferir que los organismos utilizados en este ensayo enfrentaron situaciones inusuales y adversas de salinidad, circunstancias que raramente podrían presentarse en el medio natural en el que se encuentra este organismo y por lo tanto, esto causó la disminución de la supervivencia, principalmente en los organismos que fueron cultivados a 5 ups.

En esta tesis no se observó ningún efecto benéfico de la alimentación con PUFA en relación a la supervivencia bajo condiciones de hipo- e hipersalinidad (así lo demuestra la interacción SxA no significativa). En contraste, Palacios *et al.*, (2004a) observaron que postlarvas de *L. vannamei* alimentadas con niveles altos de PUFA presentaron una mayor supervivencia a una prueba de estrés de salinidad, probablemente como efecto del alimento suministrado con altos niveles en PUFA sobre los mecanismos de osmorregulación y el desarrollo branquial. Se ha descrito también un incremento en la capacidad de osmorregulación así como de resistencia a las enfermedades infecciosas en juveniles de *L. stylirostris* alimentados con un alimento rico en PUFA al ser expuestos a estrés hiposmótico y de temperatura (Chim *et al.*, 2001). En larvas de peces se ha observado algo similar, en donde el incremento, principalmente de DHA en la dieta, ha permitido aumentar la supervivencia y crecimiento ante diferentes tipos de estrés medio ambientales, como temperatura, salinidad y oxígeno disuelto (Kanazawa, 1997). Las diferencias en los resultados, pueden deberse primeramente, al efecto que se pretendía poner en evidencia en la presente tesis en relación a los mecanismos fisiológicos con respecto a la salinidad en el experimento de estrés agudo y por lo tanto, evitar la mortalidad, en comparación con los trabajos descritos anteriormente, en que los organismos fueron expuestos a estrés intenso con la finalidad de observar un efecto de los PUFA en la mortalidad.

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

En segundo lugar, la supervivencia registrada a 5 ups en el experimento crónico no fue mejorada por la alimentación indicando que bajo estas condiciones experimentales, una dieta alta en PUFA no representaría ventaja para mejorar la supervivencia en caso de cultivo de juveniles de camarón a baja salinidad.

El crecimiento de los juveniles de camarón utilizados en el experimento agudo estuvo en un intervalo del 15 al 20%, mientras que en el experimento crónico el crecimiento fue de 55% en promedio, es decir, considerablemente mayor que en el experimento agudo, aunque los datos no se compararon estadísticamente. En la presente tesis se esperaba que los organismos del experimento agudo y aquellos organismos del experimento crónico que fueron cultivados a 30 ups presentaran un crecimiento similar. La notable disparidad en el porcentaje de crecimiento entre ambos experimentos (agudo vs. crónico) tal vez puede explicarse a partir de la frecuencia de mudas, ya que según los resultados del análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$), los organismos del experimento crónico mudaron con mayor frecuencia que los organismos del experimento agudo (Fig. 42, Anexo E). Se ha reportado que los crustáceos pueden incrementar entre un 3 y un 44% su talla durante cada muda (Lucu y Towle, 2003), por lo que un incremento en la frecuencia de mudas explica el mayor crecimiento. Sin embargo, es necesario aún esclarecer el motivo por el cual los organismos del experimento crónico mudaron con mayor frecuencia que los organismos en el experimento agudo. Es posible que hayan existido diferencias en el estadio inicial de muda de los organismos, ya que el muestreo de las poblaciones que se utilizaron de cada uno de los experimentos (agudo vs. crónico) se realizó en días distintos. Por ejemplo, se ha observado que el estadio en que los camarones consumen mayor proporción de alimento es en intermuda y que a su vez presentan mayores niveles de reservas (Chan *et al.*, 1988) las cuales están asociadas con el incremento

en la frecuencia de muda en los crustáceos (Dawirs, 1987; Ouellet *et al.*, 1992; Fernandes *et al.*, 1995). De estos trabajos, se deduce que los organismos en intermuda pueden presentar mayor crecimiento y frecuencia de mudas en los 21 días que duraron los experimentos a diferencia de organismos en otros estadios y con menores reservas. Sin embargo, es necesario evaluar esto en experimentos controlados. Por otro lado, en la Fig. 43 (Anexo E) se puede observar que la frecuencia de mudas fue mayor para los organismos cultivados a 5 y a 50 ups, en comparación con los cultivados a 30 ups. Los camarones tienden a incrementar la frecuencia de muda ante un estrés, contaminación del agua, o un ambiente en general hostil (Lozano-Avarez y Spanier, 1997; Petriella y Boschi, 1997). Por ejemplo, la razón para agregar cobre al agua para combatir parásitos externos presentes en las branquias se debe a que los camarones mudan como respuesta al estrés que representa el cobre (José Luis Ramírez, comunicación personal). Es posible que un estrés hipo- o hipersalino represente un estrés suficiente para el camarón como para que este incremente su frecuencia de mudas, lo cual parece apoyar la hipótesis de que ante un medio ambiente estresante, los organismos mudan con mayor frecuencia, pero no necesariamente por ello crecen más. El menor crecimiento en el experimento crónico se encontró en los organismos que fueron aclimatados a la salinidad de 50 ups (40%), en comparación con los organismos cultivados a 5 y 30 ups, en los cuales se observó un crecimiento mayor al 60% (Fig. 23). En organismos cultivados a 50 ups, es posible que incluso exista deshidratación durante la muda (Morris, 2001), por lo cual esperaríamos un crecimiento menor. Las variaciones en la salinidad del medio, pueden afectar más el peso de los organismos que su crecimiento, debido al reajuste del agua del medio intra- y extracelular de los tejidos como consecuencia de los cambios de salinidad. Lo anterior se corroboró con la determinación de la proporción de agua en el tejido muscular de los juveniles de camarón y se encontró que la salinidad afectó significativamente el porcentaje de humedad en el músculo de

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

los animales del experimento crónico ($P < 0.005$), pero no en los organismos del experimento agudo ($P = 0.135$; Tabla VII y XI). Los resultados del experimento de estrés crónico coinciden con los descritos por Chen y Lin (1998) en el que someten a juveniles de *Penaeus chinensis* a diferentes salinidades y temperaturas para determinar la presión osmótica y la humedad en distintos tejidos. Ellos concluyen que la humedad de los tejidos tiende a disminuir al incrementar la salinidad durante los 50 días que duró del experimento. Una pérdida de agua en el músculo podría explicar una menor ganancia de peso a 50 ups, aún si el organismo presenta mudas frecuentes, en las que aparentemente no crece por falta de expansión del tejido con agua (Mercado-Allen, 1991; Morris, 2001). Por otro lado, la falta de efecto en el experimento de estrés agudo puede explicarse con base a lo observado por Rodríguez (1981), quien describe para juveniles de *P. vannamei* y *P. stilyrostris* un incremento y disminución en el porcentaje del peso inicial de los organismos al exponerlos abruptamente a 12 y 40 ups, respectivamente; y que por lo menos *P. vannamei* tiene la capacidad de recuperar su peso inicial dentro de las primeras 12 horas, tanto a estrés agudo hipo- como hipersalino. Dado que el experimento agudo tuvo una duración de aproximadamente 15 horas, es posible que los cambios en peso dados por variaciones en el porcentaje de humedad ya no se observen.

Al igual que para la supervivencia, no se encontró interacción significativa entre alimentación y salinidad, es decir que estadísticamente el suplemento de PUFA no mejora el bajo crecimiento registrado a 50 ups. Sin embargo, al analizar la Fig. 23 se puede apreciar que a 50 ups el crecimiento fue mayor con 50% PUFA (60.8%) que con 0% PUFA (49.7%). Es probable que un análisis estadístico de mayor poder i.e. análisis de peso o crecimiento individual, en vez de haber utilizado el incremento de biomasa por réplica, sí hubiera puesto en evidencia un efecto positivo y significativo de los PUFA.

La humedad en el hepatopáncreas de los organismos del experimento de estrés agudo y crónico no varió en relación a la salinidad, sin embargo hay cierta tendencia en el crónico a mostrar el mismo comportamiento que se observó en el tejido muscular, sólo que a diferencia de éste, no se observó un incremento en el porcentaje de humedad ante el estrés hiposmótico, pero sí se encontró una disminución ante el estrés hiperosmótico. Marangos *et al.* (1989) no encontraron variaciones significativas en el contenido de humedad en el hepatopáncreas de *Penaeus japonicus* al someterlos a salinidades de 38 a 20 ups, sin embargo estas diferencias fueron significativas al exponerlos a 14 ups. Estos resultados, difieren a los encontrados en esta tesis, ya que en términos generales no se observaron variaciones en el porcentaje de humedad en el hepatopáncreas de los organismos que se mantuvieron a 5 ups con respecto al control. De acuerdo a los resultados obtenidos aquí, el porcentaje de humedad en el hepatopáncreas y músculo, y aunado a lo descrito por Marangos *et al.* (1989), se puede concluir que las variaciones en el porcentaje de humedad como consecuencia al estrés salino, son más evidentes en el músculo que en el hepatopáncreas.

Las variaciones de peso pueden deberse al contenido de humedad de los tejidos en respuesta a la salinidad del medio, como consecuencia, la concentración de proteínas puede darnos una mejor idea del crecimiento del organismo. Se observó que la concentración de proteínas en peso seco del tejido muscular es mayor en los organismos del experimento de estrés crónico en comparación del agudo (Tablas VII y XI, respectivamente). Esto puede deberse a las diferencias en el crecimiento en peso de los organismos del experimento crónico en comparación a los del experimento agudo, ya que en términos generales fue mayor en los camarones del experimento de estrés crónico. La concentración de proteínas en ambos experimentos (estrés agudo vs. crónico) no varió significativamente en relación a la salinidad, aunque sí tendieron a disminuir a 50 ups en el experimento crónico; este efecto puede indicar

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

movilización de las proteínas del músculo para enfrentar el estrés hiperosmótico. El metabolismo de las proteínas en los mecanismos de osmorregulación de una gran variedad de crustáceos ha sido ampliamente descrito por varios autores (Gilles, 1977; Gilles y Péqueux, 1981; Marangos *et al.*, 1989; Nery y Santos, 1993; Watts *et al.* 1996; Okama y Abe, 1998), los cuales mencionan un incremento en la concentración de aminoácidos libres en el medio intracelular de los tejidos de los organismos como respuesta al aumento en la salinidad, los cuales pueden ser generados a partir de las proteínas que se encuentran en la hemolinfa o del tejido muscular, tal y como se discutirá más a fondo en la sección de capacidad osmorregulatoria.

Aunado a esta situación, otro factor que pudo haber comprometido el crecimiento de estos organismos expuestos a estrés crónico hiperosmótico, es el porcentaje relativamente bajo de proteínas que se incluyó en la fabricación de los alimentos utilizados en esta tesis. Dichos alimentos contenían 36% de proteína, la cual proviene principalmente de la harina de pescado (Tabla III), y de acuerdo con los resultados de Robertson *et al.*, (1993) en que comparó el crecimiento y supervivencia de juveniles de camarón *L. vannamei* en dos salinidades distintas (12 y 46 ups) y con diferentes porcentajes de proteína (25, 35 y 45%) en el alimento, concluyen que los rendimientos en el cultivo de esta especie bajo condiciones hipersalinas están estrechamente correlacionados con el porcentaje de proteína, puesto que el crecimiento y supervivencia se incrementaron con el aumento de proteína en el alimento, los cuales fueron significativamente más altos con 45%; mientras que a 12 ups no se encontraron diferencias significativas en relación al porcentaje de proteína.

La concentración de carbohidratos en el tejido muscular (mg/g) en el experimento agudo varió significativamente en relación a la salinidad ($P < 0.01$). En este ensayo se observó un aumento en la concentración de carbohidratos al incrementarse la salinidad, e

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

independientemente del alimento (0 y 50% PUFA). En el experimento de estrés crónico, la concentración de carbohidratos fue mayor que en el experimento agudo, pero no se observaron diferencias significativas en relación a la salinidad. Estas menores concentraciones de carbohidratos en el tejido muscular de los organismos del experimento agudo, permite inferir que éstos son utilizados de manera predominante ante la eventualidad de un estrés agudo hiposmótico. Estos a su vez son movilizados vía hemolinfa, puesto que la disminución de carbohidratos en el tejido muscular se reflejó de manera particular en la concentración de glucosa (Tabla VI). Estos resultados son semejantes a los encontrados por Da Silva y Kucharski (1992) que correlacionan la disminución de la concentración de glucógeno del tejido muscular, con el incremento de glucosa al someter a *C. granulata* a estrés hiposmótico.

RESPUESTA AL ESTRÉS: LACTATO Y GLUCOSA

En la sección anterior, sobre el efecto de la alimentación, se discutió la posible respuesta de estrés causado por la manipulación de los organismos durante el muestreo. Por lo anterior cualquier respuesta adicional de estrés, como la exposición de los camarones a 5 y 50 ups durante el experimento del estrés agudo, pudiera estar enmascarada. No obstante, se observó una disminución del lactato a ambas salinidades experimentales, pero principalmente ante el estrés hiposmótico. La misma tendencia, aunque no significativa, fue observada para la glucosa. Estos resultados son difíciles de explicar, aún considerando que la manipulación haya podido enmascarar cualquier respuesta de estrés previamente inducido por los cambios de salinidad. Una explicación posible, pero que tiene que ser analizada con mayor detenimiento, es que la exposición a estrés hiposalino sobre todo, sí produjo una respuesta de estrés, que se evidencia con el aumento en las concentraciones de lactato y glucosa. Pero ante una segunda

condición de estrés, que fue la manipulación en el muestro 15 horas después, los organismos ya no pudieron responder con la misma intensidad que el grupo control, el cual mostró una respuesta máxima de estrés. La capacidad para responder a situaciones recurrentes de estrés ha sido descrita para peces, aunque se observa una respuesta acumulativa (Barton *et al.*, 1986) y se requieren más estudios en camarón para analizar la posibilidad de que éstos muestren una disminución en la respuesta de estrés bajo estas circunstancias.

En cuanto a la respuesta metabólica de estrés por cambios abruptos de salinidad, son pocos los trabajos que se han realizado y la mayoría de ellos se enfocan al estrés causado por la transferencia a un medio diluido. Así por ejemplo, Da Silva y Kucharski (1992), describen que las concentraciones de glucosa en hemolinfa alcanzaron valores cercanos a los 25 mg/dL al someter a *C. granulata* a estrés agudo hiposmótico, tras haber sido alimentados con un alimento rico en carbohidratos. Por otro lado, Rosas *et al.*, (2001) describe valores más altos de lactato que los que se obtuvieron en el presente trabajo (20 mg/dL) como respuesta al estrés hiposmótico en juveniles de *L. vannamei* y *L. setiferus*, alimentados con diferentes niveles de proteína.

CAPACIDAD OSMORREGULATORIA: PRESIÓN OSMÓTICA

Los cambios observados en la presión osmótica de la hemolinfa con respecto a la salinidad a la que fueron expuestos los juveniles de camarón reflejaron la gran capacidad de osmorregulación de esta especie. Los organismos que fueron expuestos a un medio hiposmótico (5 ups) mantuvieron una presión osmótica de 640 ± 4 y 645 ± 5 mmol/kg para agudo y crónico, respectivamente. Estas presiones son aproximadamente tres veces mayores a los valores del agua a 5 ups de salinidad (206 mmol/kg). Por otra parte, los organismos que

fueron expuestos a 50 ups mantuvieron su presión osmótica interna aproximadamente a la mitad (847 ± 8 y 817 ± 21 mmol/kg para agudo vs. crónico, respectivamente) con respecto a la salinidad del medio (1547 mmol/kg) a la que fueron expuestos. Incluso la presión osmótica de la hemolinfa de los organismos que se cultivaron y fueron aclimatados a la misma salinidad control de 30 ups (894 ± 35 mmol/kg) mostraron una tendencia a mantenerse hiposmóticos (732 ± 28 mmol/kg) con respecto a su medio. Esta capacidad de mantener su hemolinfa hiperosmótica en medios salobres e hiposmótica en medios concentrados concuerda por lo descrito por Castille y Lawrence (1981) para esta y otras especies del mismo género. Estos mismos autores describen que el punto isosmótico de *L. vannamei* se encuentra a 24.7 ups, ó 718 mmol/kg. Rodríguez (1981) menciona para la misma especie, que el punto isosmótico se encuentra en un intervalo de salinidad entre 18 y 20 ups (570 a 620 mmol/kg). Esto pudiera explicar la presión hiposmótica encontrada en los organismos que fueron cultivados a 30 ups, ya que esta salinidad se encuentra por arriba de la descrita en ambos trabajos como punto isosmótico para esta especie. En trabajos previos, se ha concluido que esta especie tiene una alta capacidad de mantener su presión osmótica interna más o menos constante hasta aproximadamente los 40 ups, posterior a esta salinidad la presión interna aumenta paulatinamente conforme incrementa la salinidad del medio externo (Rodríguez, 1981). Sin embargo los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que los juveniles logran osmorregular considerablemente por arriba de las 40 ups (Tablas VI y X). También esta especie ha demostrado tener una relativa y rápida recuperación de su presión osmótica interna ante cambios abruptos en la salinidad, ya que al exponerla a salinidades de 50 ups han mostrado una recuperación parcial a las 72 horas posteriores a la transferencia (Rodríguez, 1981). Sin embargo, los resultados del presente trabajo indican que la recuperación fue aún

más rápida dado que al término de 14.5 horas que duró la exposición al cambio de salinidad en el experimento agudo, los organismos alcanzaron osmolaridades internas muy similares a las obtenidas en los organismos del experimento crónico que fueron cultivados a las mismas salinidades por 21 días. A pesar de que estos resultados indican una buena capacidad osmorreguladora y que la presión interna puede ser ajusta en periodos relativamente cortos, observamos que no es total, dado que no se logró alcanzar el punto isosmótico, tanto en condiciones agudas como crónicas del presente trabajo.

La capacidad osmorreguladora en condiciones hipo e hiperosmóticas no fue afectada por la suplementación de PUFA en esta tesis, en contraste con lo descrito por Chim *et al.*, (2001), quienes observaron una mejor respuesta osmorreguladora ante el estrés hiposmótico (10 ups) en organismos que fueron alimentados con PUFA durante 28 días. Sin embargo, en ese trabajo, la temperatura se redujo a 11°C, a diferencia del realizado en esta tesis en que la temperatura se mantuvo constante. La disminución de la temperatura pudo haber influido consideradamente en una mayor incorporación de PUFA en las membranas celulares de los camarones (Pruitt, 1990) y modificó la fluidez de sus membranas celulares y consecuente su permeabilidad.

En los procesos de la regulación osmótica, tanto de peces (McCormick, 2001; Manzon, 2002) como de crustáceos (Péqueux y Gilles, 1981; Mantel, 1985; Wheatly y Gannon, 1995) participan iones orgánicos e inorgánicos como osmolitos en dicha osmorregulación. Los principales iones orgánicos que intervienen en este tipo de procesos son los aminoácidos libres. Gilles (1977) describió para *Eriocheir sinensis* que las proteínas en hemolinfa incrementaron bajo estrés hiposmótico y disminuyeron durante el estrés hiperosmótico. Esta disminución de proteínas está asociada con el incremento en la concentración de aminoácidos

libres en el medio intracelular, los cuales aumentan en los tejidos de los organismos para lograr el equilibrio osmótico en relación al medio ambiente hipersalino (Gilles, 1977; Gilles y Péqueux, 1981; Marangos *et al.*, 1989; Nery y Santos, 1993; Watts *et al.* 1996; Okama y Abe, 1998). Contrario a esto, se sabe que cuando los organismos son expuestos a medios hiposmóticos los aminoácidos libres disminuyen, posiblemente para ser usados durante la gluconeogénesis en branquias (Nery y Santos, 1993) y la síntesis de proteínas. En consecuencia, se esperaba una disminución de proteínas en hemolinfa en los organismos expuestos a 50 ups en comparación con los niveles a 5 y a 30 ups. La concentración de hemocianina en hemolinfa (1.15 mmol/L) fue semejante a lo encontrado para camarones cultivados en estanques (1.52 mmol/L) (Pascual *et al.*, 2003) o en *L. vannamei* cultivados a 15 y 40 ups (1.25 mmol/L) (Rosas *et al.*, 2002). Sin embargo, las proteínas en hemolinfa no fueron significativamente afectadas por la salinidad del medio (Tabla VI), pero se observaron valores ligeramente menores a la salinidad de 50 ups. Una falta de efecto sobre las proteínas de la hemolinfa ante cambios de salinidad pudiera explicarse dado que los organismos acuáticos reajustan sus niveles de proteínas y aminoácidos libres ante la eventualidad de enfrentar un estrés osmótico. Rodríguez (1981) menciona que en *L. vannamei* la concentración de proteínas disminuyó considerablemente dentro las primeras 6 horas como consecuencia a estrés hiperosmótico (50 ups), para recuperar su concentración inicial después de 48 horas.

Por otro lado, los aminoácidos libres en hemolinfa pueden obtenerse de otras fuentes, tales como la hemocianina. En el presente estudio, se encontró que la concentración de hemocianina presentó una tendencia a disminuir a 5 y 50 ups en relación a los controles ($P = 0.059$) (Tabla VI). Una disminución de hemocianina ante un cambio de salinidad también fue descrito por Rodríguez (1981), quien menciona que las proteínas totales disminuyen ante el

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

estrés hiperosmótico al que fueron expuestos juveniles de *P. vannamei* y *P. stilyrostris*, lo cual pudo deberse a la degradación de hemocianina hasta aminoácidos libres para enfrentar el “*shock*” osmótico. Para evaluar si la hemocianina fue degradada en relación a las proteínas totales de la hemolinfa, se realizó una relación hemocianina/proteína (Cheng *et al.*, 2002), la cual en los organismos cultivados a 30 ups varió desde 59 a 66%, mientras que a 5 ups la relación fue de 52.5% y a 50 ups fue de 53.6%. Estas diferencias son significativas ($P < 0.05$) en relación a la salinidad, ya que disminuyó tanto a 5 como a 50 ups (Tabla VI). Estos resultados indican que hubo una degradación de hemocianina en relación a las proteínas totales en juveniles transferidos a ambas salinidades, las cuales pudieron ser hidrolizadas hasta aminoácidos libres para ser utilizados en los procesos de osmorregulación a 50 ups y como sustrato metabólico ante el estrés hiposmótico, como lo han descrito Nery y Santos (1993).

Los aminoácidos libres pueden obtenerse de otras fuentes además de la hemolinfa. En los organismos usados en la presente tesis, se observó un incremento significativo de algunos aminoácidos libres en músculo en relación al incremento de la salinidad (Palacios, E., comunicación personal). El incremento de estos aminoácidos puede tener su explicación en los resultados obtenidos en la concentración de proteína, la cual no varió significativamente en relación a la salinidad, aunque la tendencia fue a disminuir en el experimento crónico a 50 ups tan como se mencionó en la sección de crecimiento.

En el caso de los iones inorgánicos, se ha descrito que el sodio y el cloro pueden aportar más del 80% de la presión osmótica extracelular. La regulación de las concentraciones de sodio en hemolinfa se lleva a cabo principalmente por la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$, la cual se discutirá más a fondo en la siguiente sección.

También se ha descrito que el magnesio, el calcio y el potasio participan en los procesos de osmorregulación, pero que estos iones en particular tienen menor injerencia en la presión osmótica (Duarte y Romero, 1985). Sin embargo, pueden estar afectados por los estadios de muda (Mercado-Allen, 1991; Wheatly y Hart, 1995; Wheatly y Gannon, 1995; Wilder et al., 1998) y de hecho, se ha observado que la presión osmótica varía en relación al estadio de muda (Charmantier *et al.*, 1994; Wilder et al., 1998). Tomando en cuenta lo anterior, los datos de la presión osmótica que se presentan en las tablas VI y X provienen sólo de aquellos organismos que se encontraban en intermuda.

CAPACIDAD OSMORREGULATORIA: ACTIVIDAD $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$

Las branquias son las principales estructuras encargadas de los procesos de osmorregulación, por lo tanto son las primeras en responder al estrés osmótico. Estas estructuras son relativamente simples en cuanto a la composición y grosor de su epitelio, y son precisamente por donde los organismos tienden a ganar o perder agua relativamente rápido en función del estrés osmótico. En esta tesis, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de humedad de branquias anteriores ($P<0.05$; Tabla IX) del experimento agudo, mientras que en el crónico las diferencias fueron significativas tanto para anteriores ($P<0.01$) como posteriores ($P<0.01$; Tabla XIII); en ambos tipos de branquias, la humedad fue menor en organismos cultivados a 50 ups. Este mismo efecto se demostró en branquias de *Chasmagnathus granulata* por Luvizotto-Santos *et al.*, (2003) en que sometieron a este organismo a estrés hipo- e hiperosmótico. Este efecto fue similar al que se observó en músculo y hepatopáncreas en esta tesis, en que los tejidos tienden a ganar y perder agua al ser expuestos los organismos tanto a estrés hiposmótico como hiperosmótico, respectivamente.

Resulta interesante que en el experimento agudo no se observaron interacciones con alimento y salinidad, pero en el crónico se observó una tendencia ($P=0.061$) a una menor variación de la humedad en branquias en organismos alimentados con 50% PUFA. Esto podría indicar una menor permeabilidad de las membranas en branquias de organismos cultivados a hipo- e hipersalinidad, cuando éstos son alimentados con altos niveles de PUFA.

Por otro lado, la concentración de proteínas en las branquias anteriores ($P<0.001$) y posteriores ($P<0.01$) de los organismos del experimento agudo varió significativamente en relación a la salinidad, mientras que en el crónico no se observaron diferencias significativas. Las variaciones en la concentración de proteína en las branquias de los organismos del experimento agudo con respecto a la salinidad se correlacionan en cierta medida con lo discutido en proteínas en hemolinfa y tejido muscular de esta tesis. En términos generales, se observó un aumento y disminución de la concentración de proteína ante el estrés hipo- e hiperosmótico, respectivamente. Esto puede deberse a la utilización de las proteínas en forma de aminoácidos libres en los mecanismos de osmorregulación, las cuales son movilizadas rápidamente antes el estrés osmótico, como osmolitos orgánicos. Como consecuencia del estrés hiposmótico agudo los aminoácidos libres pueden ser sintetizados a proteínas o ser utilizados como sustrato metabólico a través de la gluconeogénesis (Nery y Santos, 1993) para cubrir las demandas de energía por parte de las bombas de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPas}$ inmersas en las membranas de este tejido (Towle, 1984).

Se ha descrito en una gran variedad de trabajos ontogénicos (Charmantier y Charmantier-Duares, 1991; Brown y Terwilliger, 1992) e histológicos (Dickson *et al.*, 1991) que existen diferencias estructurales en las branquias anteriores y posteriores. Las primeras tienen mayor número de invaginaciones y epitelios más delgados, mientras que en las posteriores, se han encontrado epitelios más desarrollados, mayor número de mitocondrias,

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

incremento de retículo endoplásmico rugoso y almacenamiento de compuestos ricos en energía como el glucógeno, esto como consecuencia de la demanda energética por parte de las bombas de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasas}$, las cuales se localizan primordialmente en las branquias posteriores (Péqueux, 1995). En crustáceos se ha reportado que el transporte de iones se realiza a nivel de branquias posteriores y la respiración en las anteriores (Neufeld *et al.*, 1980; Siebers *et al.*, 1985; Holliday, 1985; Thuet *et al.*, 1988; Dickson *et al.*, 1991; Chausson y Regnault, 1995). La mayor demanda metabólica en las branquias posteriores, así como la presencia de las enzimas involucradas en los procesos de osmorregulación, principalmente de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, pueden explicar en términos generales, la mayor concentración de proteína en las branquias posteriores en relación a las anteriores en ambos experimentos. El hecho de que no se observaran diferencias significativas en la concentración de proteínas tanto en branquias anteriores como posteriores de los camarones del experimento crónico en relación a la salinidad, sustenta en cierta medida la utilización de éstas como sustrato metabólico ante el estrés osmótico agudo.

En ambos experimentos la actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ fue mayor en las branquias anteriores que en las posteriores (Tablas IX y XIII), contrario a lo descrito en otros trabajos, y en particular para postlarvas de *L. vannamei* (Palacios *et al.*, 2004a; Palacios *et al.*, en prensa). La razón por la cual se encontró mayor actividad en las branquias anteriores en relación a la salinidad es incierta, pero es posible que dentro del desarrollo de PL a juvenil de esta especie, exista una migración de las células funcionales en el transporte iónico de las branquias posteriores hacia las anteriores. Este fenómeno podría ocurrir durante el ciclo de vida natural de los crustáceos peneidos y en particular en el estadio de juvenil, ya que en este estadio es que regresan a las aguas oceánicas, donde las variaciones de salinidad son mínimas en comparación con las que ocurren en las zonas costeras. Sin embargo, la migración de las

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

células especializadas es una hipótesis que tendría que probarse por medio de la observación detenida del epitelio branquial y/o que pudiera ser determinado por medio de ensayos inmunohistoquímicos como los sugeridos por Lignot y Charmantier (2001). Otra posibilidad es que la osmorregulación de los juveniles de camarón se efectúe en relación a la posición de las branquias, y consecuentemente la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa sea particularmente mayor en una de las 8 branquias con que cuenta esta especie. Esto se ha observado en *Callinectes sapidus* expuestos tanto a estrés hipo como hiperosmótico (Neufeld *et al.*, 1980) y en *Ucides cordatus* en que sólo las branquias 5 y 6 (de un total de 7) son las encargadas de la osmorregulación ante un estrés hipo e hipersalino, respectivamente (Martinez *et al.*, 1998).

Existen una gran variedad de trabajos que hacen referencia a las diferencias estructurales entre las branquias anteriores y las posteriores, así como las diferencias implícitas en la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa como consecuencia de la función que realizan (i.e., respiración vs. transporte iónico), sin embargo existen también, varios trabajos en que no se han observado diferencias en la actividad enzimática entre la posición de las branquias (anteriores vs. posteriores). Tales son los casos de *Pacifastacus leniusculus* (Wheatly y Henry, 1987), *Homarus gammarus* (Lucu y Devescovi, 1999; Flik y Haond, 2000) y *Macrobrachium rosenbergii* (Wilder *et al.*, 2000). Estas variaciones nos lleva a deducir que la diferenciación funcional entre branquias anteriores vs. posteriores es una característica del estadio y de algunas especies de crustáceos, como cangrejos (branchyuridos) y langostinos, las cuales no necesariamente pueden encontrarse en todo tipo de crustáceos, tal y como lo señalan Lucu y Towle (2003).

En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en la actividad específica ni en la total de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa en branquias con relación a la salinidad en el experimento agudo, pero sí en la actividad total para branquias anteriores ($P < 0.05$) en el Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

experimento crónico. Los resultados obtenidos en el experimento agudo son opuestos a los descritos para otros crustáceos estuarinos, en los cuales se ha demostrado que la actividad total y específica de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa incrementan ante un estrés hiposmótico agudo. Ejemplo de ello son: *Callinectes sapidus* (Neufeld *et al.*, 1980), *Carcinus maenas* (Siebers *et al.*, 1985), *Uca pugnax* (Holliday, 1985) y *Chasmagnathus granulatus* (Castilho *et al.*, 2001). En contraste, son pocos los trabajos que evalúan la respuesta a estrés hiperosmótico agudo, pero en general también observan aumentos en la actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en distintas especies de crustáceos, como en algunos cangrejos (Neufeld *et al.*, 1980) y en *Artemia sp.* (Holliday *et al.*, 1990). Sin embargo, en peces se ha descrito ampliamente el incremento de la actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa como consecuencia en el aumento de la salinidad (Sakamoto *et al.*, 2001; McCormick, 2001).

De trabajos anteriores se deduce que la activación a corto plazo de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en crustáceos puede ser estimulada relativamente rápido (minutos-horas), posiblemente por dopamina (Sommer y Mantel, 1988). Towle *et al.*, (1976) mencionan algo similar, en que la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa *in vitro* se incrementa rápidamente (2-3 horas) en las branquias posteriores de organismos expuestos a estrés hiposmótico; mientras Lucu y Flik (1999) mencionan un incremento del 35 al 58% en la actividad de esta enzima dentro de las primeras 5 a 8 horas después de someter a *Carcinus maeneas* a estrés hiposmótico. Por lo anterior, se deduce que los tiempos que se necesitaron para alcanzar las salinidades de experimentación (15.6 y 12.5 horas para 5 y 50 ups, respectivamente) fueron los necesarios para que se observara la activación de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en los juveniles de camarón expuestos a estrés agudo. Como consecuencia, la magnitud en la respuesta de la actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en las branquias de camarón puede estar relacionada con las adaptaciones fisiológicas de los camarones peneidos a su característico ciclo de vida, en el cual los

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

juveniles se desplazan a aguas oceánicas donde las variaciones de salinidad son mínimas o casi nulas en comparación a las que suceden en esteros y lagunas costeras. Por lo tanto, se deduce que a pesar de que continúan siendo buenos osmorreguladores en el estadio de juvenil, tal y como se demuestra con los resultados de presión osmótica de esta tesis, la activación de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, al menos a nivel de las branquias como mecanismo de osmorregulación no es tan evidente o importante como en las primeras etapas de desarrollo de estos organismos, particularmente en estadio de postlarva como lo han descrito varios autores (Thuet, *et al.*, 1998; Bouaricha, *et al.*, 1991; Palacios *et al.*, 2004b).

En crustáceos existen varios trabajos que hacen referencia a los cambios en la actividad enzimática de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa en relación a los procesos de aclimatación a el estrés hipo- e hiperosmótico (Neufeld *et al.*, 1980; Holliday *et al.*, 1990). Luquet *et al.* (2002) hacen una descripción muy completa de los procesos de diferenciación celular que ocurren en las branquias de *Chasmagnathus granulatus* al someterlos a distintas salinidades de aclimatación. Estos procesos de diferenciación celular provocan una abundancia de células “captadoras” y “secretoras” de iones cuando los organismos son expuestos a periodos de aclimatación de estrés hipo- e hiperosmótico, respectivamente; y los cuales son similares a la diferenciación que ocurren en las células clorhídricas (células α y β) que se han descrito con mayor detalle en los procesos de aclimatación en peces (Evans *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 2001; McCormick, 2001; Manzon, 2002). El incremento en este tipo de células encargadas del transporte iónico está asociado a una mayor concentración de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa (Lignot y Charmantier, 2001) y por lo tanto es de esperarse que la actividad de ésta se incremente ante la eventualidad de un estrés osmótico. Lo anterior fue evidente en el experimento crónico; sin embargo, únicamente se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la actividad total de las branquias anteriores en relación a la salinidad. La mayor actividad se encontró en las Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

branquias de los organismos que fueron aclimatados a estrés hiposmótico en comparación con los cultivados en estrés hiperosmótico (medias globales = 12.0 y 7.7 $\mu\text{MPi g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para 0 y 50 ups, respectivamente), por lo que es probable que el estrés hiposmótico haya ocasionado síntesis de ATPasa. El incremento en la síntesis de esta enzima por efecto de la aclimatación se ha demostrado en algunas especies de cangrejos al ser expuestos a estrés hiposmótico (Lucu y Flik, 1999; Lovett *et al.*, 2003), mientras que en peces la síntesis de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasa se ha descrito en una gran variedad de especies al ser aclimatados tanto a estrés hipo- como hiperosmótico (Sakamoto *et al.*, 2001; McCormick, 2001). Es probable que la síntesis de esta enzima sólo se incremente ante la eventualidad del estrés hiposmótico en crustáceos, tal y como se observó en los resultados de este trabajo, donde los juveniles de camarón respondieron a cambios crónicos de salinidad, en particular a diluciones del medio y probablemente por síntesis de ATPasa; mientras que los mecanismos de activación a corto plazo de la ATPasa como respuesta al estrés agudo, aparentemente, no son tan eficientes como en estadios de postlarva.

A pesar de que la gran mayoría de los trabajos de osmorregulación de crustáceos hacen referencia a la importancia de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa dentro de la regulación iónica, existen una gran variedad de transportadores que están involucrados activamente en la osmorregulación, principalmente de cloruro de sodio (NaCl), por lo que el incremento en la capacidad de osmorregulación no puede atribuirse únicamente a la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa. Estos transportadores son: el $\text{Na}^+\text{/H}^+$, el contra transportador $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{/2Cl}^-$, canales de sodio epiteliales, entre ellos de Na^+ , y la $\text{H}^+\text{-ATPasa}$ tipo V. La función de estos transportadores, contra-transportadores y canales iónicos, así como su interacción entre ellos, son descritos ampliamente para crustáceos (Péqueux, 1995) y peces (Evans *et al.*, 1999; Sakamoto *et al.*, 2001; McCormick, 2001;

Manzon, 2002). Se ha mencionado que la participación de los transportadores, contra-transportadores y canales iónicos pueden actuar con anticipación a la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa como mecanismos de regulación iónica ante la eventualidad del estrés salino (Lucu y Towle 2003).

Por último, uno de los objetivos de la presente tesis fue analizar el efecto en conjunto (o interacción) del suplemento de PUFA y de la salinidad sobre la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasa. Esto implica también el análisis inicial de cómo influyeron de manera conjunta ambos factores sobre la composición de ácidos grasos de los distintos tejidos y posteriormente como se traduce esta influencia sobre la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasa.

En el experimento agudo, solamente variaron los niveles de PUFA en relación a la alimentación, puesto que la salinidad fue la misma para los distintos grupos de camarones durante la mayor parte del experimento, y solamente al final se realizó el cambio de salinidad. Es decir, primero fueron afectados los niveles de ácidos grasos en tejidos por el alimento, y como consecuencia de esto, los camarones respondieron de forma distinta a los cambios de salinidad. En el hepatopáncreas se observaron interacciones significativas en los porcentajes molares del 20:4(n-6) ($P<0.05$), 22:6(n-3) ($P<0.01$), así como el índice de insaturación ($P<0.01$), mientras que para el 20:5(n-3) fue sólo una tendencia ($P=0.058$). Todos los efectos interactivos del alimento y la salinidad sobre la composición de ácidos grasos en el hepatopáncreas fueron en la fracción neutra y dado que los ácidos grasos de esta fracción de lípidos forman parte los acilglicéridos y ésteres de colesterol, que a su vez todos estos constituyen los lípidos de reserva, podemos concluir que el efecto de un estrés agudo de salinidad afectó las reservas del hepatopáncreas. Es interesante que el comportamiento general de los PUFA en la fracción neutra del hepatopáncreas no varió en los camarones alimentados con 50% PUFA y expuestos a distintas salinidades, pero si varió en los camarones alimentados con 0% PUFA, donde algunos ácidos grasos insaturados fueron menores a 50 ups

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

o a 5 ups en comparación con 30 ups: esto podría indicar que los organismos alimentados con 0% de PUFA están utilizando los ácidos grasos insaturados para requerimientos energéticos. Sin embargo, esto resulta sorprendente, porque esperaríamos que los organismos con exceso de PUFA (alimentados con 50% PUFA) utilizaran los ácidos grasos insaturados acumulados como reservas, mientras que los que tienen pocos niveles de ácidos grasos insaturados (alimentados con 0% PUFA), debieran utilizar otro tipo de combustible metabólico (i.e. ácidos grasos saturados, carbohidratos o proteínas). En el caso de los carbohidratos en los hepatopáncreas sí se apreció una disminución en la concentración, tanto a 5 ups como a 50 ups, siendo la mayor a esta última salinidad, pero estas disminuciones sólo se observaron para los organismos alimentados con la dieta de 0% PUFA. Esto indica que al parecer con este alimento, el gasto energético para los fines de osmorregulación fue mayor, debido a que se utilizaron tanto ácidos grasos insaturados como carbohidratos ante los cambios abruptos de salinidad. Dicho gasto, en términos de estos combustibles metabólicos, aparentemente fue menor en los organismos alimentados con el alimento de 50% PUFA y por lo tanto existió un efecto positivo de la suplementación de PUFA, el cual puede deberse a los efectos de los PUFA en los fosfolípidos de membrana sobre la permeabilidad al agua y a los iones (Sanderman, 1978; Pequéux y Chapelle, 1982; Pequéux *et al.*, 1983).

Dadas las diferencias en la composición lipídica de las membranas de las branquias y principalmente de los ácidos grasos de la fracción polar, el siguiente paso fue evaluar los efectos de éstos en los mecanismos de osmorregulación y específicamente en términos de la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$. En necesario distinguir entre la actividad específica, que en presente tesis se considerará equivalente a la capacidad que tiene la enzima de ser activada, en comparación con la actividad total, que sería equivalente a una suma de la capacidad de activación y la capacidad de síntesis de la enzima, dado el supuesto de que toda la síntesis de

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

proteína que presenta el tejido está representada por la ATPasa (lo cual es muy probablemente no es el caso). Dado que únicamente la actividad total de la ATPasa es significativa ($P < 0.05$) y solamente en el tratamiento crónico, no así en el agudo, podemos concluir que en el tratamiento crónico hubo una tendencia a una mayor síntesis de enzima en organismos cultivados en distintas salinidades, particularmente a 5 ups, e independientemente de la alimentación. Asimismo, la actividad específica en las branquias anteriores fue afectada, aunque no de manera significativa ($P = 0.257$), por la interacción de alimentación con salinidad en el experimento crónico, por lo que podemos inferir que los cambios en la composición bioquímica de la membrana celular, principalmente de lípidos, tendieron a afectar la actividad de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa ante cambios de salinidad (Tabla XIII). En particular, se observó una tendencia a mayor actividad a 5 ups en los organismos alimentados con 0% PUFA. Esto podría interpretarse como una inactivación de la actividad específica de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPasa en el tejido branquial por los PUFA contenidos en el alimento, lo cual concordaría con los resultados descritos por Morohashi *et al.*, (1991) en que observó una inactivación de esta enzima con altas concentraciones de PUFA en *Artemia sp.*

Otra posible explicación es que ante un ambiente crónico de baja salinidad, los organismos alimentados con 0% PUFA requieran una mayor actividad de la ATPasa para poder osmorregular, en comparación con los que están a 50 ups y, particularmente, en comparación con organismos alimentados con 50% PUFA. Esto se podría deber a que las membranas celulares en branquias de organismos alimentados con 50% PUFA son menos permeables, por lo que el organismo está realizando un menor esfuerzo de osmorregulación y, por ende, la actividad de la ATPasa es menor. La permeabilidad al agua se da por vía intercelular, por poros membranales en la bicapa lipídica, o directamente a través de la bicapa lipídica (Morris *et al.*, 1982). En este último caso, es probable que sea modulada por la Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

composición de ácidos grasos de la membrana. En las branquias se puede incrementar la síntesis de ácidos grasos saturados y reducir la fluidez de la membrana al exponer a cangrejos y anfípodos a un medio diluido (Whitney, 1974; Morris et al., 1982). Si los camarones tienen una respuesta semejante a la de cangrejos y anfípodos, entonces al ser cultivados en medios hipersalinos esperaríamos un incremento en los niveles de PUFA y lo contrario se esperaría en medios diluidos. Como consecuencia, la alimentación con PUFA no necesariamente proporcionaría una ventaja a organismos cultivados en medio diluidos. Sin embargo, lo anterior no concuerda con la acumulación de 20:5(n-3) en la fracción polar de branquias en el experimento crónico en los camarones expuestos a estrés hiposalino (Fig. 39). Por lo tanto, si la permeabilidad es afectada por la dieta y por la salinidad a la cual fueron cultivados los organismos, es posible que en juveniles de camarones el efecto no sea a nivel de ácidos grasos, sino a nivel de fosfolípidos presentes en la membrana (Sandermann, 1978; Pequéux y Chappelle, 1982; Pequéux *et al.*, 1983). En esta tesis no fue posible la determinación de los diferentes tipos de fosfolípidos, por lo que se recomienda evaluar en estudios posteriores.

En las branquias se observaron interacciones significativas para el 20:5(n-3) ($P < 0.05$), así como algunas otras tendencias, en la fracción polar en el experimento agudo: aparentemente, la alimentación con distintos niveles de PUFA afectó la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos presentes en la membrana celular en organismos expuestos a un estrés agudo de salinidad. En los lípidos de reserva, de nuevo no se observó un efecto significativo sobre los organismos alimentados con 50% de PUFA, pero sí sobre aquellos alimentados con 0% de PUFA: el índice de insaturación fue significativamente menor a 5 y 50 ups en comparación con 30 ups. Se esperaba que los organismos utilizaran ácidos grasos acumulados como reservas en las branquias ante un estrés agudo de salinidad. Sin embargo, los cambios mayores se observaron en la fracción polar ante un estrés agudo. Dado que los Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

ácidos grasos de reserva en las branquias no fueron afectados por el estrés de salinidad, se puede concluir que los ácidos grasos de la fracción polar en branquias fueron movilizados para otros procesos y no en relación a la demanda de energía. Alternativamente y dado que la concentración de lípidos neutros en las branquias es mínima comparada con los lípidos polares es posible que los ácidos grasos de la fracción polar constituyeran una fuente de energía local para fines de osmorregulación.

X. CONCLUSIONES

- La supervivencia en cultivo durante 21 días fue significativamente menor a 5 ups que a 30 ups, mientras que a 50 ups las diferencias no son significativas. **El enriquecimiento del alimento con PUFA no influyó significativamente en la supervivencia** de los juveniles de camarón en ninguno de los dos experimentos.
- El menor crecimiento se observó en los camarones cultivados a 50 ups en el experimento de estrés crónico. Dichos animales presentaron los niveles más bajos de proteína y la menor proporción de agua en músculo. Aparentemente, **a 50 ups hay deshidratación del músculo e hidrólisis de proteína muscular para la producción de aminoácidos libres destinados a la osmorregulación.** Este menor crecimiento a 50 ups fue parcialmente contrareestado por la alimentación con 50% PUFA.
- Los organismos cultivados a 5 y a 50 ups del experimento crónico presentaron una mayor frecuencia de muda que aquellos cultivados a 30 ups, **posiblemente como una consecuencia del estrés salino.**
- Los organismos que fueron expuestos a un medio hiposmótico presentaron una presión osmótica aproximadamente tres veces mayor a los valores del agua, mientras que los organismos expuestos a 50 ups mantuvieron su presión osmótica interna aproximadamente a la mitad con respecto a la salinidad del medio. La presión osmótica en hemolinfa de los organismos que estuvieron a 30 ups mostraron una tendencia a mantenerse ligeramente hiposmóticos con respecto al medio. Lo anterior concuerda con un punto isosmótico de aproximadamente 25 ups reportado para *L.*

vannamei, y demuestra **la capacidad de osmorregular en juveniles de esta especie mas allá de los límites de salinidad encontrados en el ambiente natural**. No se encontraron diferencias significativas en la presión osmótica en relación con la alimentación.

- El suplemento de alimento rico en PUFA influyó sobre la composición de ácidos grasos de los lípidos de reserva y de membrana, tanto del hepatopáncreas como de las branquias. Estos resultados nos permiten concluir que **el tipo de alimentación y el tiempo de experimentación fueron suficientes para que se observara un efecto sobre los tejidos de los organismos, puesto que fueron alimentados con dietas distintas en cuanto a composición de ácidos grasos**.
- La actividad total de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ se incrementó únicamente en el experimento de estrés crónico y particularmente la actividad fue mayor en los organismos cultivados a 5 ups. **Aparentemente, los juveniles de camarón responden a cambios crónicos de salinidad, en particular a diluciones del medio, con síntesis de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, por lo que hace pensar que los mecanismos de activación de la ATPasa aparentemente no son tan eficientes en este estadio como lo son en postlarvas**.

X. REFERENCIAS

- Akiyama, D.M. y W.G. Dominy. (1989). Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. En: Texas Shrimp Farming Manual, Vol. 1: Grow-out Technology. Texas Agricultural Extension Service and Texas A&M University, Sea Grant College Program. 50 p.
- Anger, K. y G. Charmantier. (2000). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in a mangrove crab, *Sesarma curacaoense* (Decapoda, Grapsidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 251, 265-274.
- A.O.A.C. (1995). Official Methods of Analysis, 15th edition. Association of Analytical Chemist, Washington, D.C. 1094 pp.
- Bautista, M.N. y P.F. Subosa. (1997). Changes in shrimp feed quality and effects on growth and survival of *Penaeus monodon* juveniles. Aquaculture, 151, 121-129.
- Barton, B.A., Schreck, C.B. y L.A. Sigismondi. (1986). Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress response in juvenile chinook salmon. Transactions of the American Fisheries Society 115, 245-251.
- Berlind, A. y F.I. Kamemoto. (1977). Rapid water permeability changes in eyestalkless euryhaline crabs and in isolated, perfused gills. Comp. Biochem. Physiol. 58A, 383-385.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brown, C.A. y N.B. Terwilliger. (1992). Developmental changes in ionic and osmotic regulation in the Dungeness crab, *Cancer magister*. Biol.Bull., 182, 270-277.
- Bouaricha, N., Thuet, P., Charmantier-Daures, M. y J.P. Trilles. (1991). Na-K ATPase and carbonic anhydrase activities in larvae, postlarvae and adults of the shrimp *Penaeus japonicus* (Decapoda, Penaeidea). Comp. Biochem. Physiol. 100A, 433-437.
- Brunet, M., Arnaud, J. y J. Mazza. (1994). Gut structure and digestive cellular processes in marine crustacea. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 32, 335-367.
- Camba, E., Pedrazzoli, A., Yaguachi, M. y T. Akiyama. (1993). Requerimiento de proteínas en dietas artificiales para juveniles de *Penaeus vannamei*. Acuicultura Tropical. 1, 7-12.
- Carreño, D., S. Dumas e I.S. Racotta (1999). Respuestas metabólicas del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) al estrés inducido por distintas formas de manipulación experimental. XLII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Zacatecas, México.

- Carriker, M.R. (1967). Ecology of estuarine benthic invertebrates: a perspectiva. 442-487 pp. En: Estuaries (Ed. G.H. Lauf). Washington, DC: American Association for the Advancement of Science.
- Castilho, P.C., Martins, I.A. y A. Bianchini. (2001). Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 256, 215–227 pp.
- Castille Jr., F.L. y A.L. Lawrence. (1981). The effect of salinity in the osmotic, sodium, and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. Comp. Biochem. Physiol. 106 B, 293-296.
- Chan, S.M., Rankin, S.M. y L.L. Keeley. (1988). Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. Biol. Bull. 175, 185-192.
- Charmantier, G. (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. Invert. Reprod. Develop., 33, 177-190.
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Janssen, K.P.C., Aiken, D.E. y F. Van Herp. (1994). Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. Gen. Comp. Endocrinol. 94, 281-293.
- Charmantier, G., Soyeux, C. y Aquacop. (1994). Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 178, 233-246.
- Charmantier, G. y M. Charmantier-Daures. (1991). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in *Cancer irroratus*; Elements of comparison with *C. borealis* (Crustacea, Decapoda). Biol. Bull. 180, 125-134.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Bouaricha, N., Thuet, P., Aiken, D.E. y J.P. Trilles. (1988). Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two Decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. Biol.Bull., 175, 102-110.
- Chausson, F. y M. Regnault. (1995). Teneur en glycogène des branchies postérieures de *Carcinus maenas* (Crustacé, Décapode): comparaison entre branchies antérieures et postérieures. Cah.Biol.Mar., 36: 291-297.
- Chen, J.C. y J.N. Lin. (1998). Osmotic concentration and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles reared at different salinity and temperature levels. Aquac. 164, 173-181.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y. y C.T. Chen. (1994). Changes of oxyhemocyanin, protein and free aminoacid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. Com. Biochem. Physiol. 109A, 339-347.

- Cheng, W., Liu, C.H., Yan, D.F. y Chen, J.C. (2002). Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. *Aquaculture* 211, 325-339.
- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Le Moullac, G., Galois, R. y J.L.M. Martin. (2001). Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of *Penaeid* prawns to environmental stress?. *Aquac. Res.* 32, 91-94.
- Crockett, E.L. (1999). Lipid restructuring does not contribute to elevated activities of Na^+/K^+ -ATPase in basolateral membranes from the gill of seawater acclimated eel (*Anguilla rostrata*). *J.Exp.Biol.* 202, 2385-2392.
- Coutteau, P. y Mourente, G. (1997). Lipid classes and their content of n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) in *Artemia franciscana* after hatching, HUFA-enrichment and subsequent starvation. *Mar. Biol.* 130, 81-91.
- Da Silva, R.S.M. y L.C.R. Kucharski. (1992). Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A, 631-634.
- Dall, W. (1981). Osmoregulatory ability and juvenile habitat preference in some penaeid prawns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 54, 55-64.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. y D.J. Sharples. (1990). The Biology of the Penaeidea. *Advances in Marine Biology*, Vol. 27. Academic Press. 489 p.
- Dalla-Via, G.J. (1986). Salinity responses of the juvenile shrimp *Penaeus japonicus*. II. Free amino acids. *Aquaculture* 55, 307-316.
- Dawirs, R.R. (1987). Influence of limited starvation periods on growth and elemental composition (C,N,H) of *Carcinus maenas* (Decapoda: Portunidae) larvae reared in the laboratory. *Mar. Biol.* 93, 543-549.
- Dickson, J.S., Dillaman, R.M., Roer, R.D. y D.B. Roye. (1991). Distribution and characterization of ion transporting and respiratory filaments in the gills of *Procambarus clarkii*. *Biol.Bull.*, 180: 154-166.
- Djemli-Shipkolye, A., Raccach, D., Pieroni, G., Vague, P., Coste, T.C. y A. Gerbi. (2002). Differential effect of w3 PUFAS supplementations on Na,K -ATPase and Mg -ATPase activities: Possible role of the membrane w3/w6 ratio. *J. Membrane Biol.* 191, 37-47.
- Duarte, C.E. y G.C. Romero. (1985). Regulación iónica y osmótica en juveniles de camarón *Penaeus brasiliensis*, Latreille (Crustacea: Decapada:Penaeidae). *Bol. Inst. Oceanog. Univ. Oriente*, 24 (1-2): 3-10.

- Duran-Gomez, R., Rodriguez, J. M., y J. Morales. (1991). Stress-tests: a practical tool to control postlarval shrimp quality. 358-360 pp. En: Lavens, P, Sorgeloos, P., Jaspers, E. y Ollevier, E. Larvi '91 Fish & Crustacean Larviculture Symposium. Ghent, Belgium.
- Eckhard, E., Pierrot, C., Thuet, P., Van Herp, F., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.P. y G. Charmantier. (1995). Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsys marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. Gen. Comp. Endocrinol. 99, 169-177.
- Escutia, S. (2001). Estado de cultivo de camarón. En: Primer Reunión Nacional de Investigadores, Productores y Proveedores de Camarón. Mazatlán, Sin. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Instituto Nacional de la Pesca.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. y W.T.W. Potts. (1999). Ionic transport in the fish gill epithelium. J. Exp. Zoology 283, 641-652.
- FAO. (2002) Yearbook of Fishery Statistics. Aquaculture Production. FAO Statistics. Vol. 90 No.2. Roma pp. 1-30.
- Fernandes, I., Basterrechea, M., Oliva, M. y Noa, M. (1995). Variations des lipides totaux, acide gras et sterols chez la crevette blanche *Penaeus schmitti* aux differents stades du cycle de mue. Rev. Inv. Mar. 16, 171-176.
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Sarojini, R., y P.S. Reddy. (1994). Biogenic amines in crustaceans: Identification, localization, and roles. J. Crust. Biol. 14, 413-437.
- Flik, G. y C. Haond. (2000). Na⁺ and Ca⁺ pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the european lobster *Homarus gammarus*: effects of dilute sea water. J. Exp. Biol. 203, 213-220.
- Frolov, A.V., Pankon, S.L., Geradze, K.N. y S.A. Pankova. (1991). Influence of salinity on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). Aspects of adaptation. Comp. Biochem. Physiol. 99A, 541-550.
- Gilles, R. (1977). Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. Comp. Biochem. Physiol. 56A, 109-114.
- Gilles, R. y A. Péqueux. (1981). Cell volume regulation in crustaceans: relationship between mechanism for controlling and intracellular fluids. J. Exp. Zoology. 215, 351-362.
- González-Félix, M.L., Lawrence, A.L., Gatlin, D.M.I. y M. Perez-Velazquez. (2003). Nutricional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentration and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. Aquaculture Nutrition 9, 105-113.

- González-Félix, M.L., Gatlin, D.M.I., Lawrence, A.L. y M. Perez-Velazquez. (2003). Nutricional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: II. Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition* 9, 115-122.
- Goytortúa-Bores, E. (2000). Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) para camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Colima, Col., México. 86 p.
- Gross, M.G. (1972). *Oceanography: A view of the Earth*. Englewood Cliffs, NJ. Prentice Hall. 581 p.
- Hatlen, B., Jobling, M. y B. Bjerkeng. (1998). Relationships between carotenoid concentration and colour of fillets of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), fed astaxanthin. *Aquacult. Res.* 29, 191-202.
- Henry, R.P. (1996). Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu.Rev.Physiol.*, 58: 523-538.
- Henry, R.P. (2001). Environmentally mediated carbonic anhydrase induction in the gills of euryhaline crustaceans. *J.Exp.Biol.* 204, 991-1002.
- Henry, R.P. y J.W. Cameron. (1983). The role of carbonic anhydrase in respiration, ion regulation, and acid-base balance in the aquatic crab *Callinectes sapidus* and the terrestrial crab *Gecarcinus lateralis*. *J.Exp.Biol.*, 103: 205-223.
- Holliday, C.W.; Roye, D.B. y R.D. Roer. (1990). Salinity-induced changes in branchial Na^+/K^+ -ATPase activity and transepithelial potential difference in the brine shrimp *Artemia salina*. *J.Exp.Biol.* 151, 279-296.
- Kiron, V. y A.D. Diwan. (2000). Chloride ion regulation in an eyestalk-ablated prawn *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Indian J. Fish.* 31, 345-351.
- Kimelberg, H.K. y D. Papahadjopoulos. (1972). Phospholipid requirements for $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPase activity: head-group specificity and fatty acid fluidity. *Biochim. Biophys. Acta.* 282, 272-292.
- Kanazawa, A. (1997). Effects of docosahexanoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture* 155, 129-134.
- Kontara, E., Coutteau, P. y P. Sorgeloos. (1997). Effect of dietary phospholipids for an incorporation of n-3 highly unsaturated fatty acids in postlarval *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 158, 305-320.

- Laubier, A. (1990). Penaeid prawns. En: Aquaculture Vol. 1. Barnabé, G. (Editor.) Ellis Horwood, Engalnd. 465-500 p.
- Lee, Y.-K., Tan, H.-M y C.-S Low. (1989). Effect of salinity of medium on cellular fatty acid composition of marine alga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae). J. Appl. Phycol. 1,19-23.
- Leray, C., Chapelle, S., Duportail, G. y A. Florentz. (1984). Changes in fluidity and 22:6(n-3) content in phospholipids of trout intestinal brush-border membrane as related to environmental salinity. Biochim. Biophys. Acta 778, 233-238.
- Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C. y G. Charmantier. (2000). Osmoregulatory capacity as tool in monitoring the physiological condition an the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191, 209-245.
- Lignot, J.H. y G. Charmantier. (2001). Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity during the early development of the european lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). J. Histochem. Cytochem. 49, 1013-1023.
- Lozano-Alvarez, E. y E. Spanier. (1997). Behaviour and growth of captive spiny lobsters (*Panulirus argus*) under the risk of predation. Marine and Freshwater Research. Volume 48 Number 8 1997. 707-714
- López-Martínez, J., Morales-Bojorquez, E., Paredes-Mallon, F., Lluch-Belda, D. y C. Cervantes-Valle. (2000). La pesquería de camarón de altamar en Sonora. En: Lluch-Belda, D., Elourduy-Garay, J., Lluch-Cota, S.E. y G. Ponce-Díaz (eds.) BAC: Centros de Actividad Biológica del Pacífico Mexicano. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Lovett, D.L., Ricart, T.M., Tanner, C.A. y D.W. Towle. (2003). Chronic exposure of the blue crab, *Callinectes sapidus*, to low salinity stimulates expression of Na⁺, K⁺-ATPase α -subunit mRNA and protein in gills. J. Int. Comp. Biol.
- Lucu, C. y M. Devescovi. (1999). Omoregulation and branquial Na⁺-K⁺-ATPase in lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute seawater. J. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 234, 291-304.
- Lucu, C. y G. Flik. (1999). Na⁺/K⁺-ATPase and Na⁺/Ca⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. Am. J. Physiol. 276, R490-R499.
- Lucu, C. y D.W. Towle. (2003). Na⁺/K⁺ ATPase in gills of aquatic crustacea. Comp. Biochem. Physiol. 135A, 195-214.
- Luquet, C.M. Genovese, G. Rosa, G.A. y G.N. Pellerano. (2002). Ultrastructure changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnatus granulatus* (Decapoda:Graspide) in diluted and concentrated seawater. Mar. Biol. 141, 753-760.

- Luvizotto-Santos, R., Tony Lee, J., Pereira Branco, Z., Bianchini, A. y L.E.M Nery. (2003). Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool.* 295A, 200-205.
- Mantel, L.H. (1985). Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *Amer.Zool.* 25, 253-263.
- Manzon, L.A. (2002). The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *General and Comparative Endocrinology.* 125, 291-310.
- Martinez, C.B., Harris, R.R. y M.C. Santos. (1998). Transepithelial potencial differences and sodium fluxes in isolated perfused gills of the mangrove crac (*Ucides cordatus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part. A* 120, 227-236.
- Martínez-Córdova, L.R. (1999). Cultivo de camarones peneidos: principios y prácticas. AGT Editores, México. 283 p.
- Marangos, C., Brogen, C.H., Alliot, E., y H.J. Ceccaldi. (1989). The influence of water salinity on the free amino acid concentration in muscle and hepatopancreas of adult shrimps, *Penaeus japonicus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 17, 589-594.
- Mercado-Allen, R. (1991). Changes in the blood chemistry of the american lobster, *Homarus americanus*, H. Milne Edwards, 1837, over the molt cycle. *J. Shellfish Res.* 10, 147-156.
- Mendoza, R. (1992). Etude de la vitellogénèse et de sa stimulation chez les crevettes péneides par des facteurs hétérologues et homologues. Thèse de Doctorat; Université de Bretagne Occidentale. 200 pp.
- McCoid, V., Miget, R. y G. Finne. (1984). Effect of environmental salinity on the free amino acid composition and concentration in penaeid shrimp. *Journal of Food Science*, 49,327-330.
- McCormick, S.D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Amer. Zool.* 41, 781-794.
- McGraw, W. J., Davis, D. A., Teichert-Coddington, D. R. y D.B. Rouse. (2002). Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. *J. World Aquacult. Soc.* 33, 78-84.
- Morohashi, M., Tsuchiya, K., Mita, T. y M. Kawamura. (1991). Identification of (Na-K) ATPase inhibitor in brine shrimp, *Artemia salina*, as long-chain fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 161B, 69-72.
- Morris, S. (2001). Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 204, 979-989.

- Morris, R.J., Lockwood, P.M. y M.E. Dawson. (1982). An effect of acclimation salinity on the fatty acid composition of the gill phospholipids and water flux of the amphipod crustacean *Gammarus duebeni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72A, 497-503.
- Naessens, E., Van Hauwaert, A., Cobo, M. L., Townsend, S., Ramos, X., Wouters, R. y P. Lavens. (1995). Dietary n-3 HUFA and DHA/EPA requirements of *Penaeus vannamei* postlarvae. 217-220 pp. In: Lavens, P, Jaspers, E., and Roelants, I. (Editors), Larvi '95 Fish & Shellfish larviculture symposium, Ghent, Belgium.
- Nan, F.H., Sheen, S.S., Liu, P.C. y S.N. Chen. (1993). The effect of eyestalk ablation on growth, haemolymph composition and gill Na⁺, K⁺ ATPase activity of *Penaeus monodon* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 106, 621-626.
- Nery, L.E.M. y E.A. Santos. (1993). Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B, 747-753.
- Neufeld, G.J., Holliday, C.W. y Pritchard, J.B. (1980). Salinity adaptation of gill Na₂K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 211, 215-224.
- Ouellet, P., Taggart, C.T. y K.T. Frank. (1992). Lipid condition and survival in shrimp (*Pandalus borealis*) larvae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 368-378.
- Okama, E. y H. Abe. (1998). Effects of starvation and D- or L-alanine administration on the free D- and L-alanine levels in the muscle and hepatopancreas of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. and Physiology*, 120A, 681-686.
- Pascual, C., Gaxiola, G. y C. Rosas. (2003). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean. *Mar. Biol.* 142, 735-745.
- Palacios, E., Ibarra, A.M. y I.S. Racotta. (2000). Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 185, 353-371.
- Palacios, E., Bonilla-Hernández, A., Pérez, A., I. S. Racotta, y R. Civera. (2004a). Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 299: 201-215.
- Palacios, E., Bonilla-Hernández, A., Luna, D. y I.S. Racotta. (2004b). Survival, Na⁺/K⁺-ATPase and lipid response to salinity challenge in fed and starved white Pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*, in press.
- Péqueux, A. y R. Pilles. (1981). Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. *J. Exp. Biol.* 92, 173-186.

- Péqueux, A. y S. Chapelle. (1982). (Na⁺ +K⁺)-ATPase activity and phospholipids in two euryhaline crabs as related to changes in the environmental salinity. *Marine Biology Letters* 3, 43-52.
- Péqueux, A., Chapelle, S., Wanson, S., Goffinet, G. y C. Francois. (1983). (Na⁺ +K⁺)-ATPase activity and phospholipid content of various fractions of the posterior gills of *Carcinus maenas* and *Ericheris sinensis*. *Marine Biology Letters* 4, 267-279.
- Péqueux, A. (1995). Osmotic regulation in crustacean. *J. of Crustacean Biology* 15, 1-60.
- Pérez-Farfante, I. y B. Kensley. (1997). Peneid and sergestoid shrimp and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Memoires Du Museum National D' Historie Naturelle*, Paris.
- Petriella, A.M. y E.E. Boschi. (1997). Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. *Invest. Mar. Valparaiso*, 25, 135-157.
- Pruitt, N.L. (1990). Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *J. Thermal Biology*. Vol. 15(1) 1-8 pp.
- Poon, R., Richards, J.M. y W.R. Clark. (1981). The relationship between plasma membrane lipid composition and physical-chemical properties. II. Effect of phospholipid fatty acid modulation on plasma membrane physical properties and enzymatic activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 649, 58-66.
- Racotta, I.S. y R. Hernández-Herrera. (2000). Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. and Physiology*. 125A, 437-443.
- Racotta, I.S. y E. Palacios. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 351-356.
- Rees, J.F., Cure, K., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P. y P. Menasveta. (1994). Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*. 122, 193-207.
- Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo, J. y A. Lawrence. (1987). Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aquacult. Soc.* 18, 180-185.
- Robertson, L., Lawrence, A.L. y F. Castille. (1993). Interaction of salinity and feed protein level on growth of *Penaeus vannamei*. *J. Applied Aquaculture*. 2, 43-54.
- Rodríguez, G.A. (1981). Osmoregulation and total serum protein of two species of penaeidean shrimps from pacific coast of Mexico. *J. Crustacean Biology*, 1(3): 392-400.

- Roe, J.H. (1955). The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.* 212, 335-343.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G. y A. Van Wormhoudt. (2001). Effect of dietary protein and energy levels on growth, oxygen consumption, haemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *L. setiferus* (Linne) juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquacult. Res.* 32, 531-547.
- Sanchez, A., Pascual, C., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G. y C. Rosas. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: The effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.
- Sandermann, H. (1978). Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 515, 209-237.
- Samocha, T.M., Lawrence, A.L. y W.A. Bray. (1993). Design and operation of an intensive nursery raceway system for penaeid shrimp. 173-210 pp. En: *CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture* (McVey, J.P. Edit.).
- Sakamoto, T., Uchida, K. y S. Yokota. (2001). Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. *Zoological Science.* 18, 1163-1174.
- SEPESCA (1990). Acuicultura, la nueva oportunidad. Secretaría de Pesca, México. 47 pp.
- Siebers, D., Winkler, A., Lucu, C., Thedens, G. y D. Weichart. (1985). Na-K-ATPase generates an active transport potential in the gills of the hyperregulating shore crab *Carcinus maenas*. *Mar.Biol.* 87, 185-192.
- Sommer, M. y Mantel, L.H. (1991). Effects of dopamine and acclimation to reduce salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of the green crab *Carcinus maenas* (L.) *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 364-368.
- Tackaert, W., Abelin, P., Léger, P., y P. Sorgeloos. (1992). Stress resistance as a criterium to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures. 393-403 pp. En: Pessoa, J. (Editores), *Proceedings III Simposio Brasileiro sobre cultivo de camarao*. Aquacultura, Brasil, .
- Tacon, A. (1990). *Standard Methods for the Nutrition and Feeding of the Farmed Fish and Shrimp*. Washington: Argent Laboratories Press. 120 pp.
- Thuet, P., Charmantier-Daures, M. y G. Charmantier. (1988). Relation entre osmoregulation et activites d'ATPase Na⁺-K⁺ et d'anhydrase carbonique chez larves et postlarves de *Homarus gammarus* (L.) (Crustacea:Decapoda). *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* 115, 249-261.
- Towle, D.W. (1984). Membrane-bound ATPase in arthropod ion-transporting tissues. *Amer. Zool.* 24, 177-185.

- Watts, S.A. Yeh, E.W. y R.P. Henry. (1996). Hypoosmotic stimulation of ornithine decarboxylase activity in the brine shrimp *Artemia franciscana*. J. Exp. Zool. 274, 15-22.
- Wheatly, M.G. y A.T. Gannon. (1995). Ion regulation in crayfish: Freshwater adaptations and the problem of molting. Amer. Zool. 35, 49-59.
- Wheatly, M.G. y M.K. Hart. (1995). Hemolymph ecdysone and electrolytes during the molting cycle of crayfish: A comparison of natural molts with those induced by eyestalk removal or multiple limb autotomy. Physiol. Zool. 68, 583-607.
- Wheatly, M.G. y R.P. Henry. (1987). Branchial and antennal gland Na^+/K^+ -dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J.Exp.Biol. 133, 73-86.
- Whitney, J.O. (1974). The effect of external salinity upon lipid synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun) and in the spider crab *Libinia emarginata* (Leech). Comp. Biochem. Physiol. 49, 433-440.
- Wilder, M.N., Ikuta, K., Atmomarsono, M., Hatta, T. y K. Komuro. (1998). Changes in osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle. Comp. Biochem. Physiol. 119, 941-950.
- Wilder, M.N., Thanh Huong, D.T., Atmomarsono, M., Thanh Hien, T.T., Truong Quoc, P. y Wei-Jun, Y. (2000). Characterization of Na/K-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. Comp. Biochem. Physiol. 125A, 377-388.
- Wouters, R., Vanhauwaert, A., Naessens, E., Pedrazzoli, A. y P. Lavens. (1997). The effect of dietary n-3 HUFA and 22:6n-3/20:5n-3 ratio on white shrimp larvae and postlarvae. Aquacult.Int. 5, 113-126.
- Wu, B.J., Else, P.L., Storlien, L.H. y A.J. Hulbert. (2001). Molecular activity on Na/K-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids. J. Exp. Biol. 204, 4271-4280.

ANEXO A: FABRICACIÓN DEL ALIMENTO

Los ingredientes sólidos fueron pulverizados finamente y cernidos a través de un tamiz de 250 micras. Posteriormente, tanto los microingredientes (premezcla de vitaminas y minerales, fosfato dibásico de sodio, gretina, cloruro de colina y vitamina C) como los macroingredientes (harina de trigo, pasta de soya, harina de sardina) fueron mezclados por separado por 10 minutos. A continuación los microingredientes fueron adicionados a los macroingredientes, en una mezcladora KITCHEN AID® para su homogenización por 10 minutos. Una vez mezclados todos los ingredientes sólidos se agregaron las emulsiones previamente mezcladas (lecitina de soya, BHT y la respectiva emulsión ICES 0% PUFA ó 50% PUFA). Una vez lograda una masa uniforme (5 minutos) y bien mezclada, se agregó el 30% del peso de la masa de agua corriente. La masa resultante fue extruida en un molino de carne comercial TOR-REY® en dos ocasiones para obtener “pellets” de 2 mm de diámetro, mismos que fueron cortados a mano y colocados en una campana de extracción para secarlos a temperatura ambiente hasta alcanzar una humedad aproximada al 10%. Posteriormente los alimentos fueron etiquetados y empacados en bolsas de plástico para su conservación a -70°C. Conforme se utilizaba el alimento se sacaba de congelación y se guardaba en refrigeración a 4°C.

Diagrama de flujo para la elaboración de alimentos

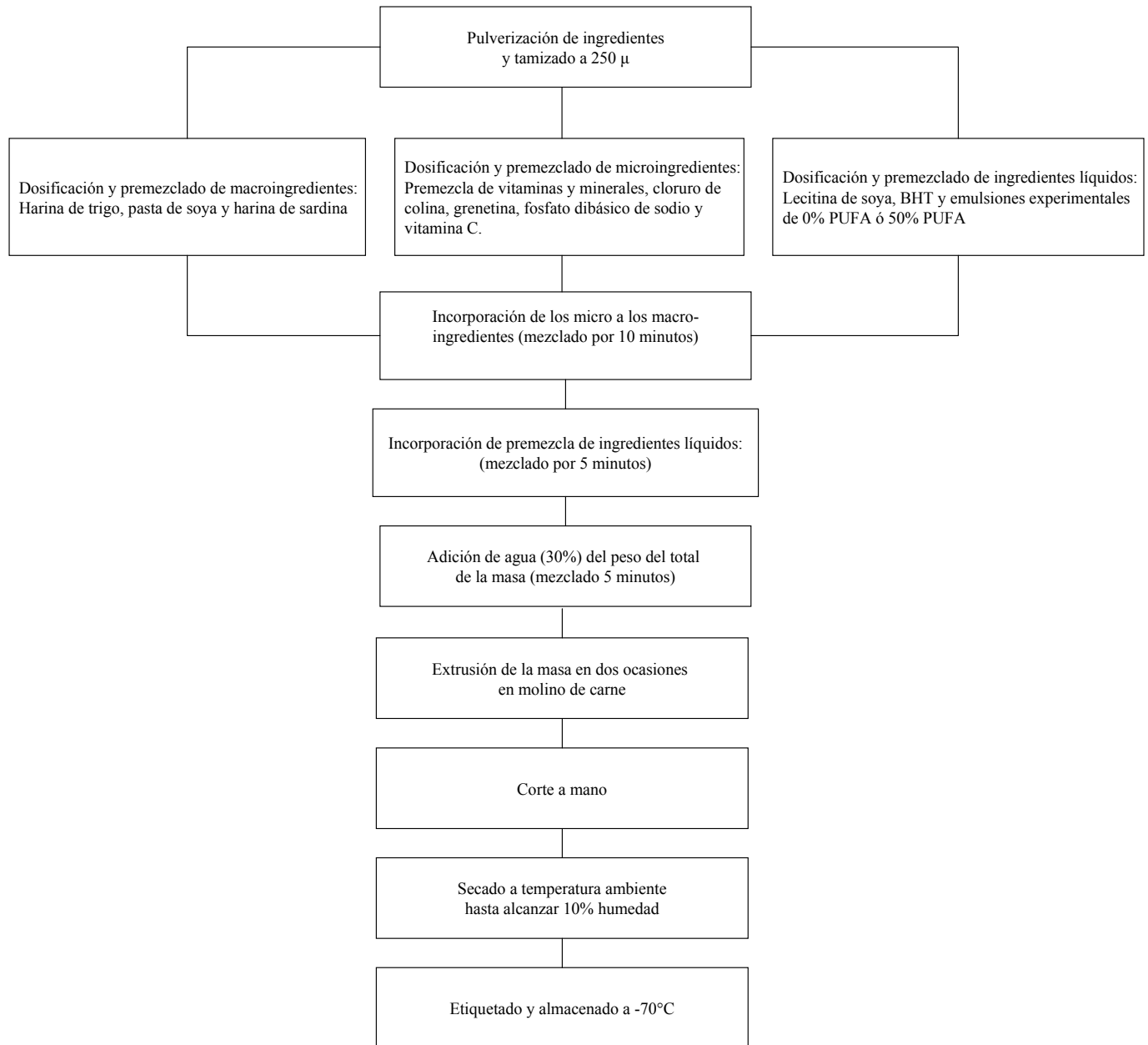


Tabla XXX. Composición de premezcla de vitaminas.

Vitaminas	UI ó mg/kg de alimento	g/100 g de premezcla	Número de catálogo ICN ¹ , Sigma ²
Vitamina A acetato (Retinol)	15000 UI	0.01	160079 ¹
Vitamina D ₃ (Colocalciferol)	7500 UI	3.72	160107 ¹
Vitamina E (Tocoferol)	400	7.93	100555 ¹
Vitamina K ₃ Menadiona	20	0.40	102259 ¹
Tiamina (B ₁) mononitrato	150	2.98	T-4625 ²
Riboflavina (B ₂)	100	1.98	R-4500 ¹
Piridoxina (B ₆) hidroclicorada	50	0.99	102777 ¹
Ácido D-pantoténico	100	1.98	101228 ¹
Niacina (Ac. Nicotínico)	300	5.95	102446 ¹
D-Biotina	1	0.02	B-4501 ²
Inositol	500	9.92	I-5125 ²
Ácido fólico	20	0.40	101725 ¹
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.1	0.002	103271 ¹
Celulosa (vehículo)	1000	19.84	191499 ¹

¹ICN Biomedicals Inc. Ohio, USA. ²Sigma Co. St. Louis, USA.

Tabla XXXI. Composición de premezcla de minerales.

Mineral	g/kg de alimento	g/ 100 g de premezcla	Número de catálogo Sigma ¹
KCl	0.5	14.29	P-3911
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	14.29	M-9397
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.09	2.57	Z-0501
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0234	0.67	M-3634
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.005	0.15	C-6917
KI	0.05	0.15	P-4286
CoCl ₂ · 2H ₂ O	0.0025	0.07	C-2644
Na ₂ HPO ₄	2.37	67.71	S-0876

¹Sigma Co. St. Louis, USA.

Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo.

Tesis de Maestría

ANEXO B: PRESIÓN OSMÓTICA

La osmolaridad es una expresión de la concentración total de partículas disueltas en una solución sin importar su tamaño, densidad, configuración o carga eléctrica. El principio para determinar la presión osmótica de una solución es indirecto, puesto que se fundamenta en los cambios de energía libre de un solvente al estar en contacto con solutos, modificando sus propiedades coligativas, como lo son la presión de vapor, el punto de congelación y el punto de ebullición. A comparación de un solvente puro como el agua, una solución tiene menor presión de vapor y punto de congelación. Los cambios relativos en las propiedades de una solución son relacionados linealmente con el número de partículas disueltas en el solvente, sin embargo no son relacionadas necesariamente con el peso del soluto, puesto que estas pueden disociarse en dos o más componentes iónicos. La presión osmótica se expresa en términos de “presión” es decir en mmHg ó kPa, sin embargo puede calcularse en términos de concentración total de solutos (mmol/kg), siendo este un concepto teórico.

Anexo C: Técnica de Na⁺ - K⁺ -ATPasa

Preparación de reactivos

SOLUCIÓN BUFFER DE HOMOGENIZACIÓN (pH=7.2)

8.56 g de sacarosa
0.22 g de EDTA
0.0754 g de Tris base

Aforar a 100 mL con agua desionizada

MEDIO DE INCUBACIÓN +K (pH=7.2)

0.487 g NaCl
0.186 g KCl
0.349 g TH (Tris HCl) *normalmente se requiere un poco más para ajustar pH.
0.060 g TB (Tris base)

Aforar a 50 mL con agua desionizada

MEDIO DE INCUBACIÓN -K (pH=7.2)

0.633 g NaCl
0.483 g TH (Tris HCl) *normalmente se requiere un poco más para ajustar pH.
0.060 g TB (Tris base)

Aforar a 50 mL con agua desionizada

SOLUCIÓN DE ATP/Mg

0.102 g de MgCl
0.138 g ATP

Disolver en 10 mL de agua de desionizada. Estos pueden pesarse previo a su utilización y mantenerse mezclados en congelador, y al momento de ser utilizados disolverse con el agua desionizada.

SOLUCIÓN OUABAINA/-K

Disolver 0.00585 (0.002925) g de ouabaina en 10 (5) mL de medio de incubación -K

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Liofilizar aproximadamente de 20 a 80 mg de tejido.
2. Pulverizar con ayuda de una espátula.
3. Resuspender en 1 mL de buffer de homogenización.
4. Agitar en vortex.
5. Utilizar 100 µL para cada medio de incubación (ver procedimiento).
6. **Mantener en todo momento la muestra en baño de hielo.**

REACTIVO DE AMARILLO DE VANADOMOLIBDATO

- **SOLUCIÓN A:** Aforar a 250 mL con agua desionizada, 112.5 mL de HClO₄ (ácido perclórico)
- **SOLUCIÓN B:** Disolver 0.5 g de metavanadato de amonio en agua desionizada tibia y aforar a 125 mL. Una vez disuelto y aforado guardar en refrigerador.
- **SOLUCIÓN C:** Disolver 10 g de molibdato de amonio y aforar a 125 mL con agua desionizada.
- **SOLUCIÓN D:** Mezclar las anteriores soluciones en el siguiente orden.

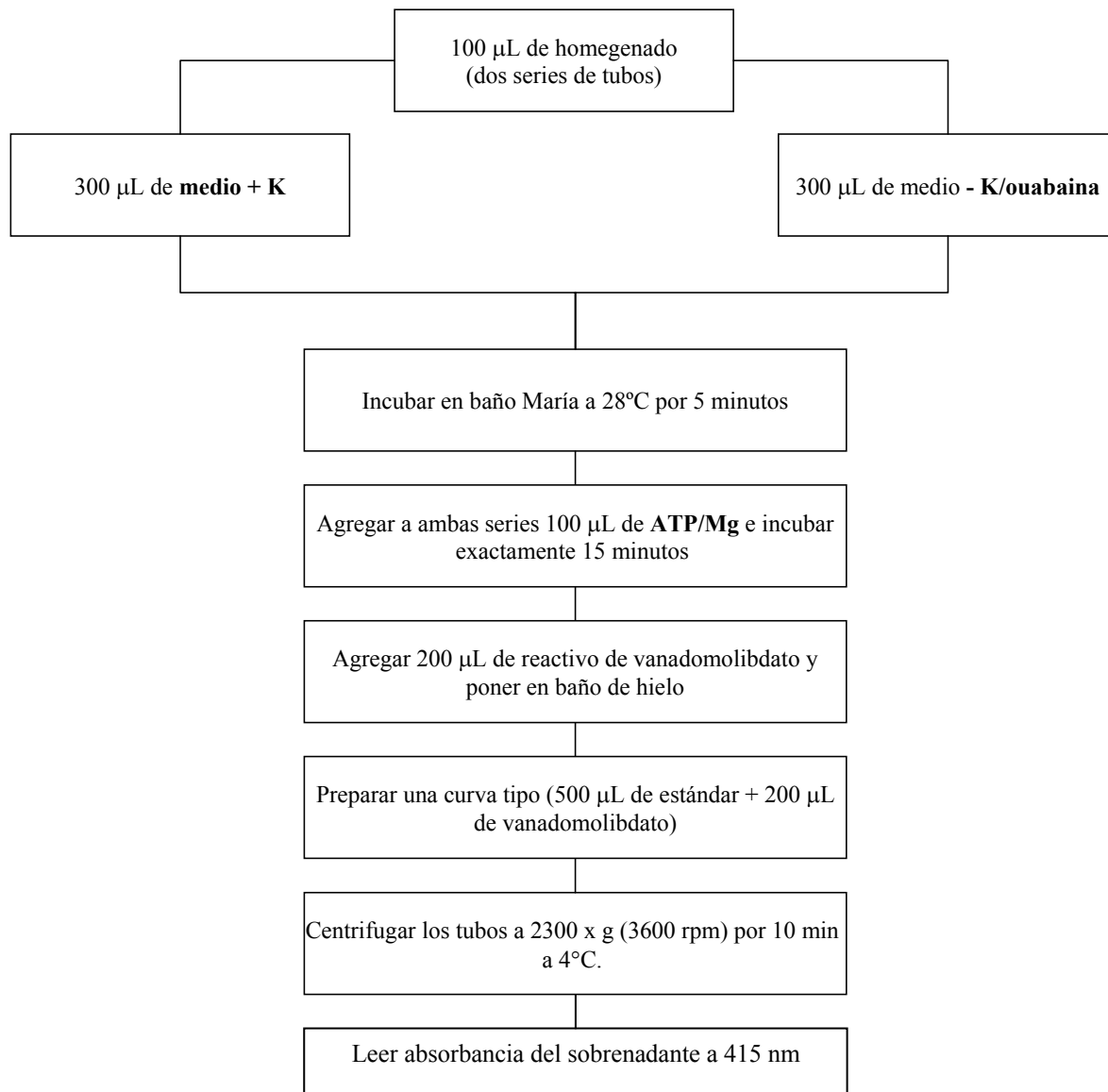
La solución **C** se agrega a la solución **B** (ya fría) LENTAMENTE y con agitación. Una vez perfectamente mezcladas y disueltas se agrega a la solución **A**, LENTAMENTE y con agitación.

Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

CURVA TIPO

- a. Pesar 0.00879 g de KH₂PO₄ anhidro (secar previamente en estufa a 70°C por 12 hr).
- b. Disolver en 10 mL de agua desionizada. Concentración = 200 mg/mL de Pi.
- c. Mantener en refrigeración.
- d. Preparar curva de calibración diluyendo la solución anterior 1:4 para obtener una concentración de 50 mg/L de fósforo (Pi). A partir de esta realizar diluciones 1:2 para obtener concentraciones de: 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125 y 0.390625 mg/mL de fósforo (Pi).

PROCEDIMIENTO



- La temperatura óptima para camarón es 28°C.
- Al agregar el ATP/Mg se hace en ambos tubos (+K) y (-K) de cada muestra, antes de continuar con la siguiente muestra.
- La curva tipo se puede hacer por separado y el blanco es 500 µL de agua desionizada y 200 µL de vanadomolibdato.
- Preferentemente utilizar tubos de 125x100 para centrifugar. El sobrenadante se puede tomar con micropipeta.

Cálculos

$$\text{Actividad total} = [((+K)-(-K)) \cdot (\text{tiempo de incubación}) \cdot (\text{Vol. Total}/100 \mu\text{L})] / [(b) \cdot (\text{peso muestra})]$$

$$\begin{aligned} \text{Actividad específica} &= \text{Lo anterior (uM Pi} \cdot \cancel{\text{g de tejido}}) / \text{mg prot} \cdot \cancel{\text{g de tejido}} \\ &= \text{uM Pi/mg de proteína} \end{aligned}$$

ANEXO D: ANALISIS DE ÁCIDOS GRASOS

a) Separación de lípidos de la muestra.

Se pesó 1g de muestra (en caso del alimento), para branquias y hepatopáncreas se utilizaron los tejidos íntegros. Estos se colocaron en 6 mL de solución Folch, la cual es una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 (v/v) en viales de vidrio. A cada una de las muestras se les agregó 10 μ L del antioxidante BHT (2,6-di-ter-butyl-p-cresol) (0.5 mg/mL) y 10 μ l (2 mg/mL) del estándar interno 23:0. Posteriormente se dejaron reposar por 24 hrs a -20°C . A continuación se disgregaron los tejidos por medio de un homogenizador de vidrio. El homogenizado se separó a la mitad para guardar una de ellas como respaldo y el resto se utilizó para separar en lípidos neutros (LN) y lípidos polares (LP). Esta separación se llevó a cabo por medio de microcolumnas preparadas con micropipetas Pasteur rellenas de fibra de vidrio y sílice hidratado al 6%. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) Los 3 mL de la muestra se evaporan con nitrógeno (N_2) hasta concentrarla en \pm 0.5 mL, procurando que la temperatura del extracto no superara los $15\text{-}20^{\circ}\text{C}$. Una vez concentrada la muestra se agregó en la microcolumna, el vial se enjuagó con 0.5 mL de solución Folch y se agregó a la microcolumna.
- 2) A continuación se adicionaron 10 mL de cloroformo:metanol (98:2 v/v) a la columna para eluir los lípidos neutros de la muestra. La solución se recuperó en tubos de vidrio con tapa de teflón y se guardaron a -20°C .
- 3) Posteriormente se agregaron 15 mL de metanol a la columna para eluir los lípidos polares de la muestra, procurando que la frecuencia de goteo fuera similar a la

obtenida en el paso anterior, y esto se logra inyectando nitrógeno (N_2) para regular el flujo. Una vez eluidos y recuperados los 15 mL de metanol, se les adicionó 10 μ l de BHT y 10 μ l de 23:0, puesto que los anteriormente adicionados se recuperan en la fracción neutra. La solución se recuperó y guardó en tubos de vidrio con tapa de teflón a -20°C .

Cada una de las fracciones (neutra y polar) se separó en dos partes iguales. Una de ellas fue utilizada en la determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases, mientras que el resto se conservó para la cuantificación de los tipos de lípidos por cromatografía en capa fina con detección por ionización en flama (Iatroscan TCL/FID). (Resultados que no se muestran en esta tesis).

b) Derivatización de los ácidos grasos.

La mitad de las fracciones de lípidos neutros (5 mL) y polares (7.5 mL) previamente separadas para la derivatización se evaporaron a sequedad por medio de una centrifuga- evaporador, en caso de ser necesario para evaporar completamente se utilizó nitrógeno (N_2). Una vez conseguida la evaporación total, se les agregó 1 mL de trifloruro de boro (BF_3) y colocaron en bloques de calentamiento a 95°C por 15 minutos. Trascurrido este tiempo se retiraron del calentamiento y se dejaron enfriar. Los metil-ésteres (FAME) fueron recuperados al agregar 1 mL de hexano. Para eliminar los residuos y recuperar los FAME se realizaron dos lavados agregando 1.5 mL de H_2O destilada, después de agitar los tubos se centrifugaron a 2000 rpm. por 5 minutos a 4°C para separar en dos fases.

La fase inferior (agua + BF_3 + restos de carbohidratos) se separó de la fase superior (hexano + FAME), eliminando la primera con pipetas Pasteur y agregando agua nuevamente, repitiendo el procedimiento de lavado hasta lograr el congelamiento de la fase acuosa a -20°C . Logrado el congelamiento, se recuperó la fase de hexano con los FAME y se guardaron en viales ámbar de 1 mL con tapón de teflón. Los FAME se analizaron en un cromatógrafo de gases HP G 1800B equipado con una columna polar DBMAX y detector de masas, usando helio como gas acarreador. La identificación de los FAME se realizó comparando el tiempo de retención de la muestra contra estándares (SIGMA). La concentración se calculó en base con el área del estándar interno 23:0 recuperado y el peso de la muestra, aplicando un factor de corrección en relación con el número de carbonos y número de dobles enlaces de cada ácido graso, calculado a partir de la pérdida para cada estándar externo.

ANEXO E: FRECUENCIA DE MUDAS

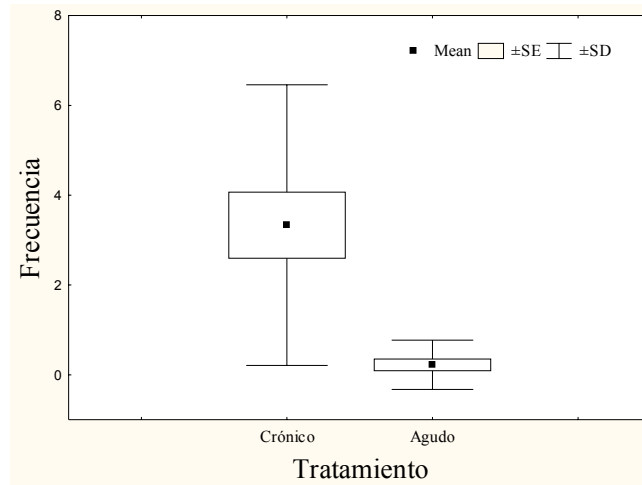


Fig. 42 Frecuencia de mudas de los organismos de los experimentos de estrés crónico y agudo.

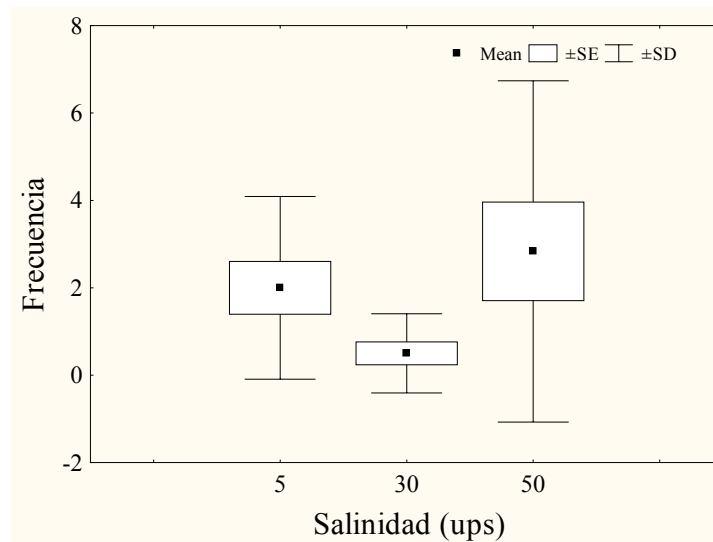


Fig. 43 Frecuencia de mudas de los organismos del experimento de estrés crónico cultivados a 5, 30 y 50 ups.

ANEXO F: TABLAS DE ÁCIDOS GRASOS

Tabla XIV. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0% pufa			50% pufa			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	2.87 \pm 0.13	2.87 \pm 0.10	2.74 \pm 0.15	0.61 \pm 0.02	0.72 \pm 0.04	0.47 \pm 0.05	0.136	0.000	0.767
16:0	19.21 \pm 0.52	18.41 \pm 0.27	19.29 \pm 0.50	14.16 \pm 0.18	14.42 \pm 0.22	14.70 \pm 0.41	0.323	0.000	0.374
18:0	4.89 \pm 0.15	6.01 \pm 0.30	5.40 \pm 0.48	4.80 \pm 0.23	5.00 \pm 0.49	5.65 \pm 0.70	0.224	0.435	0.336
16:1(n-7)	3.67 \pm 0.18 ^a	3.07 \pm 0.17 ^b	3.82 \pm 0.27 ^a	2.26 \pm 0.13 ^d	2.77 \pm 0.19 ^c	2.20 \pm 0.20 ^d	0.902	0.000	0.005
18:1(n-7)	22.74 \pm 0.36	21.04 \pm 0.49	22.71 \pm 0.30	12.68 \pm 0.16	12.51 \pm 0.13	13.02 \pm 0.61	0.018	0.000	0.131
18:1(n-7)	4.76 \pm 0.13	4.53 \pm 0.19	5.11 \pm 0.18	3.60 \pm 0.18	4.13 \pm 0.30	4.03 \pm 0.20	0.169	0.000	0.138
18:2(n-6)	21.03 \pm 0.58	20.40 \pm 0.19	20.70 \pm 0.41	19.63 \pm 0.50	19.74 \pm 0.81	17.44 \pm 1.60	0.281	0.013	0.277
18:3(n-3)	1.84 \pm 0.10	1.80 \pm 0.07	1.84 \pm 0.09	1.70 \pm 0.08	1.76 \pm 0.17	1.26 \pm 0.20	0.143	0.022	0.101
20:1(n-9)	1.27 \pm 0.04 ^c	1.39 \pm 0.09 ^c	1.31 \pm 0.05 ^c	2.15 \pm 0.08 ^b	2.01 \pm 0.04 ^b	2.44 \pm 0.12 ^a	0.046	0.000	0.008
20:2(n-6)	1.83 \pm 0.05	2.01 \pm 0.07	1.85 \pm 0.06	2.36 \pm 0.12	2.06 \pm 0.11	2.61 \pm 0.36	0.471	0.003	0.113
20:4(n-6)	1.51 \pm 0.10	1.66 \pm 0.12	1.11 \pm 0.07	1.40 \pm 0.06	1.49 \pm 0.19	1.67 \pm 0.26	0.492	0.450	0.048
20:5(n-3)	3.39 \pm 0.18	3.91 \pm 0.30	2.70 \pm 0.10	10.50 \pm 0.28	9.95 \pm 0.34	10.40 \pm 0.58	0.409	0.000	0.058
22:5(n-3)	0.43 \pm 0.04	0.48 \pm 0.01	0.36 \pm 0.02	2.06 \pm 0.05	1.86 \pm 0.12	1.84 \pm 0.17	0.287	0.000	0.384
22:6(n-3)	3.75 \pm 0.21 ^c	5.65 \pm 0.34 ^b	4.57 \pm 0.36 ^{bc}	12.88 \pm 0.33 ^a	11.86 \pm 0.55 ^a	12.55 \pm 0.55 ^a	0.491	0.000	0.002
Σ SAT.	28.51 \pm 0.40	29.03 \pm 0.33	28.93 \pm 0.70	21.63 \pm 0.15	22.22 \pm 0.57	23.09 \pm 1.04	0.315	0.000	0.637
Σ MONO	34.37 \pm 0.39 ^a	32.00 \pm 0.69 ^b	34.87 \pm 0.35 ^a	24.11 \pm 0.08 ^c	24.76 \pm 0.35 ^c	25.34 \pm 0.45 ^c	0.002	0.000	0.004
Σ PUFA	37.12 \pm 0.68 ^{bc}	38.97 \pm 0.53 ^b	36.21 \pm 0.81 ^{bc}	54.26 \pm 0.21 ^a	53.01 \pm 0.82 ^a	51.58 \pm 1.09 ^a	0.019	0.000	0.133
Σ HUFA	10.20 \pm 0.50 ^{bc}	12.68 \pm 0.70 ^b	9.68 \pm 0.52 ^{bc}	28.64 \pm 0.34 ^a	26.93 \pm 0.27 ^a	28.05 \pm 1.08 ^a	0.341	0.000	0.003
(n-3)/(n-6)	2.4 \pm 0.07	2.8 \pm 0.09	2.7 \pm 0.13	6.1 \pm 0.23	6.1 \pm 0.47	5.3 \pm 0.38	0.296	0.000	0.125
22:6/20:5	1.11 \pm 0.02 ^c	1.46 \pm 0.08 ^b	1.70 \pm 0.11 ^a	1.23 \pm 0.06 ^c	1.20 \pm 0.07 ^c	1.22 \pm 0.07 ^c	0.003	0.002	0.001
I. Insat.	143 \pm 2	154 \pm 3	142 \pm 3	232 \pm 1	223 \pm 2	224 \pm 3	0.106	0.000	0.004

Únicamente los ácidos grasos mayores de 1% se muestran en la tabla. Los resultados para los factores fijos usados en el ANOVA bifactorial se muestran en las dos últimas columnas (S = salinidad; A = alimento e interacción S x A). En caso de existir interacción significativa, se aplicó un análisis de Tukey para comparar entre medias; las letras indican las diferencias.

SAT: Saturados.

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insat.: Índice de insaturación.

Tabla XV. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	17.64 \pm 1.61 ^{ab}	14.02 \pm 1.39 ^b	20.04 \pm 1.82 ^a	3.21 \pm 0.38 ^c	4.60 \pm 1.23 ^c	2.63 \pm 0.68 ^c	0.308	0.000	0.016
16:0	116.95 \pm 4.98	89.36 \pm 6.70	140.09 \pm 8.73	74.47 \pm 7.90	89.32 \pm 23.14	80.74 \pm 17.91	0.287	0.005	0.093
18:0	29.84 \pm 1.80	28.78 \pm 0.76	38.45 \pm 1.22	24.79 \pm 1.52	28.91 \pm 6.78	28.04 \pm 3.01	0.184	0.065	0.283
16:1(n-7)	22.23 \pm 0.65 ^{ab}	14.99 \pm 1.58 ^b	28.08 \pm 3.09 ^a	12.04 \pm 1.71 ^b	17.15 \pm 4.19 ^{ab}	12.14 \pm 2.80 ^b	0.295	0.001	0.006
18:1(n-9)	139.09 \pm 8.43	102.35 \pm 8.57	164.96 \pm 9.70	66.56 \pm 6.72	78.04 \pm 21.10	74.25 \pm 10.97	0.120	0.000	0.062
18:1(n-7)	28.95 \pm 0.88 ^{ab}	21.96 \pm 1.71 ^b	37.05 \pm 2.37 ^a	19.02 \pm 2.33 ^b	24.10 \pm 5.01 ^{ab}	21.52 \pm 4.06 ^b	0.111	0.005	0.025
20:1(n-9)	7.79 \pm 0.64	6.76 \pm 0.61	9.50 \pm 0.55	11.14 \pm 0.72	12.34 \pm 3.16	13.0 \pm 2.46	0.511	0.007	0.769
18:2(n-6)	129.02 \pm 9.84	98.89 \pm 6.91	151.06 \pm 11.56	103.39 \pm 11.83	128.16 \pm 38.63	103.29 \pm 32.01	0.809	0.423	0.221
18:3(n-3)	11.36 \pm 1.11	8.80 \pm 0.93	13.53 \pm 1.36	9.01 \pm 1.20	12.00 \pm 4.08	7.81 \pm 2.81	0.977	0.382	0.153
20:2(n-6)	11.23 \pm 0.81	9.79 \pm 0.98	13.42 \pm 0.80	12.18 \pm 0.72	12.68 \pm 3.56	14.98 \pm 4.56	0.443	0.380	0.922
20:4(n-6)	9.16 \pm 0.46	7.91 \pm 0.39	8.03 \pm 0.57	7.24 \pm 0.44	8.36 \pm 1.63	8.06 \pm 0.58	0.982	0.471	0.304
20:5(n-3)	20.64 \pm 1.38	18.73 \pm 1.11	19.71 \pm 1.71	54.53 \pm 4.07	61.51 \pm 16.93	54.85 \pm 9.65	0.930	0.000	0.842
22:5(n-3)	2.61 \pm 0.25	2.34 \pm 0.21	2.62 \pm 0.27	10.76 \pm 1.02	12.27 \pm 3.83	10.67 \pm 3.02	0.937	0.000	0.875
22:6(n-3)	22.81 \pm 1.46	27.11 \pm 1.31	33.41 \pm 3.85	67.62 \pm 6.93	75.26 \pm 20.63	67.52 \pm 12.94	0.826	0.000	0.785
Σ SAT.	173.84 \pm 8.06	140.50 \pm 8.82	209.39 \pm 10.22	113.26 \pm 10.54	135.21 \pm 33.87	122.80 \pm 22.50	0.283	0.002	0.097
Σ MONO	209.69 \pm 10.15	155.54 \pm 12.46	253.44 \pm 15.63	126.37 \pm 12.20	152.49 \pm 38.58	140.17 \pm 32.38	0.188	0.002	0.066
Σ PUFA	226.93 \pm 13.46	188.38 \pm 10.84	264.21 \pm 20.56	284.15 \pm 26.96	335.94 \pm 94.77	287.56 \pm 68.48	0.918	0.076	0.453
Σ HUFA	61.97 \pm 3.00	60.80 \pm 2.42	70.63 \pm 6.71	149.54 \pm 12.85	168.67 \pm 45.97	150.07 \pm 27.93	0.926	0.000	0.815
I. Insat.	875 \pm 45	743 \pm 41	1033 \pm 79	1210 \pm 112	1406 \pm 388	1230 \pm 267	0.904	0.024	0.504
Total (AG)	611 \pm 31	484 \pm 32	727 \pm 45	524 \pm 50	624 \pm 167	551 \pm 123	0.610	0.583	0.222

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados.

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XVI. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuesto a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.69 \pm 0.05	0.60 \pm 0.02	0.60 \pm 0.05	0.26 \pm 0.01	0.24 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.124	0.000	0.439
16:0	12.70 \pm 0.31	11.17 \pm 0.21	11.14 \pm 0.41	10.85 \pm 0.35	9.90 \pm 0.40	10.48 \pm 0.33	0.004	0.000	0.239
18:0	7.70 \pm 0.13	7.86 \pm 0.24	7.61 \pm 0.17	7.39 \pm 0.40	7.09 \pm 0.53	6.64 \pm 0.58	0.520	0.040	0.682
16:1(n-7)	1.76 \pm 0.11	1.53 \pm 0.05	1.59 \pm 0.04	1.05 \pm 0.05	1.20 \pm 0.08	0.97 \pm 0.09	0.243	0.000	0.034
18:1(n-9)	14.15 \pm 0.27	12.58 \pm 0.34	13.02 \pm 0.36	7.40 \pm 0.14	7.00 \pm 0.32	7.05 \pm 0.40	0.012	0.000	0.185
18:1(n-7)	3.38 \pm 0.08	3.26 \pm 0.08	3.31 \pm 0.11	2.71 \pm 0.12	2.98 \pm 0.19	2.75 \pm 0.12	0.704	0.000	0.271
18:2(n-6)	25.15 \pm 0.78	24.50 \pm 0.52	24.66 \pm 1.47	11.93 \pm 0.28	11.83 \pm 0.50	10.68 \pm 0.24	0.520	0.000	0.691
18:3(n-3)	2.34 \pm 0.14	2.22 \pm 0.07	2.29 \pm 0.20	0.83 \pm 0.03	0.83 \pm 0.07	0.62 \pm 0.03	0.485	0.000	0.449
20:1(n-9)	0.97 \pm 0.06 ^c	1.19 \pm 0.08 ^c	1.08 \pm 0.05 ^c	1.32 \pm 0.06 ^b	1.26 \pm 0.03 ^{ab}	1.47 \pm 0.10 ^a	0.163	0.000	0.048
20:2(n-6)	1.99 \pm 0.11	2.44 \pm 0.11	2.13 \pm 0.06	2.41 \pm 0.13	2.39 \pm 0.12	2.74 \pm 0.30	0.284	0.019	0.122
20:4(n-6)	4.00 \pm 0.30	3.62 \pm 0.18	3.56 \pm 0.18	3.17 \pm 0.19	3.62 \pm 0.29	3.65 \pm 0.26	0.989	0.214	0.128
20:5(n-3)	9.54 \pm 0.44	9.43 \pm 0.59	9.56 \pm 0.45	22.56 \pm 0.82	22.24 \pm 0.95	22.42 \pm 0.44	0.944	0.000	0.986
22:5(n-3)	0.76 \pm 0.06	0.76 \pm 0.04	0.74 \pm 0.06	1.73 \pm 0.10	1.89 \pm 0.08	1.73 \pm 0.04	0.324	0.000	0.431
22:6(n-3)	8.79 \pm 0.65	12.88 \pm 0.36	12.89 \pm 0.77	20.00 \pm 1.11	21.21 \pm 0.94	22.33 \pm 0.64	0.001	0.000	0.201
Σ SAT.	22.55 \pm 0.42	21.15 \pm 0.30	20.80 \pm 0.54	20.20 \pm 0.84	18.75 \pm 0.99	18.83 \pm 0.84	0.068	0.001	0.946
Σ MONO	21.64 \pm 0.34	19.92 \pm 0.35	20.26 \pm 0.36	14.06 \pm 0.29	13.92 \pm 0.47	13.80 \pm 0.52	0.055	0.000	0.143
Σ PUFA	55.81 \pm 0.73	58.93 \pm 0.49	58.93 \pm 0.67	65.74 \pm 1.10	67.32 \pm 1.45	67.37 \pm 1.18	0.038	0.000	0.684
Σ HUFA	24.38 \pm 1.33	27.83 \pm 0.96	28.03 \pm 1.43	48.85 \pm 1.27	50.36 \pm 1.93	51.51 \pm 1.19	0.076	0.000	0.784
(n-3)/(n-6)	0.69 \pm 0.04	0.83 \pm 0.03	0.85 \pm 0.07	2.52 \pm 0.06	2.54 \pm 0.15	2.69 \pm 0.05	0.135	0.000	0.685
22:6/20:5	0.92 \pm 0.05 ^b	1.38 \pm 0.07 ^a	1.35 \pm 0.06 ^a	0.89 \pm 0.07 ^b	0.96 \pm 0.03 ^b	1.00 \pm 0.02 ^b	0.000	0.000	0.003
I. Insat.	214 \pm 5	233 \pm 4	234 \pm 5	310 \pm 6	318 \pm 9	323 \pm 6	0.025	0.000	0.647

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados.

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Tabla XVII. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.76 \pm 0.06	0.67 \pm 0.04	0.71 \pm 0.06	0.33 \pm 0.03	0.31 \pm 0.04	0.28 \pm 0.01	0.318	0.000	0.618
16:0	13.87 \pm 0.65	12.44 \pm 0.59	13.22 \pm 0.64	14.03 \pm 0.95	12.89 \pm 1.42	12.76 \pm 0.74	0.335	0.948	0.870
18:0	8.39 \pm 0.29	8.79 \pm 0.60	9.04 \pm 0.43	9.57 \pm 0.80	9.33 \pm 1.32	8.15 \pm 0.98	0.832	0.678	0.443
16:1(n-7)	1.93 \pm 0.15 ^a	1.70 \pm 0.07 ^{ab}	1.88 \pm 0.06 ^a	1.34 \pm 0.05 ^{cd}	1.57 \pm 0.19 ^c	1.17 \pm 0.08 ^d	0.563	0.000	0.040
18:1(n-9)	15.43 \pm 0.50	14.03 \pm 0.79	15.40 \pm 0.29	9.55 \pm 0.50	9.11 \pm 1.04	8.60 \pm 0.71	0.415	0.000	0.396
18:1(n-7)	3.69 \pm 0.16	3.64 \pm 0.19	3.93 \pm 0.22	3.48 \pm 0.19	3.88 \pm 0.45	3.35 \pm 0.21	0.783	0.397	0.293
20:1(n-9)	1.05 \pm 0.04	1.33 \pm 0.11	1.28 \pm 0.08	1.69 \pm 0.07	1.62 \pm 0.13	1.78 \pm 0.09	0.217	0.000	0.165
18:2(n-6)	27.41 \pm 1.03	27.31 \pm 1.40	29.08 \pm 1.17	15.40 \pm 0.86	15.38 \pm 1.68	12.96 \pm 0.49	0.938	0.000	0.144
18:3(n-3)	2.55 \pm 0.17	2.48 \pm 0.16	2.69 \pm 0.18	1.08 \pm 0.08	1.09 \pm 0.16	0.76 \pm 0.05	0.810	0.000	0.138
20:2(n-6)	2.16 \pm 0.08	2.73 \pm 0.22	2.51 \pm 0.06	3.10 \pm 0.18	3.07 \pm 0.26	3.34 \pm 0.42	0.374	0.001	0.411
20:4(n-6)	4.38 \pm 0.40	4.02 \pm 0.19	4.24 \pm 0.32	4.07 \pm 0.27	4.60 \pm 0.36	4.40 \pm 0.21	0.939	0.563	0.355
20:5(n-3)	10.41 \pm 0.60	10.49 \pm 0.75	11.37 \pm 0.78	29.09 \pm 1.76	28.38 \pm 1.39	27.20 \pm 0.91	0.914	0.000	0.429
22:5(n-3)	0.83 \pm 0.06	0.85 \pm 0.04	0.88 \pm 0.08	2.21 \pm 0.10	2.45 \pm 0.24	2.10 \pm 0.10	0.405	0.000	0.311
22:6(n-3)	9.56 \pm 0.66 ^a	14.28 \pm 0.26 ^a	15.36 \pm 1.27 ^a	25.54 \pm 0.59 ^c	27.03 \pm 1.24 ^b	27.02 \pm 0.61 ^b	0.001	0.000	0.049
Σ SAT.	24.62 \pm 1.02	23.59 \pm 1.17	24.68 \pm 1.08	26.14 \pm 1.94	24.52 \pm 2.97	22.98 \pm 1.78	0.652	0.866	0.637
Σ MONO	23.60 \pm 0.79	22.19 \pm 1.02	24.00 \pm 0.55	18.13 \pm 0.91	18.11 \pm 1.91	16.77 \pm 0.93	0.805	0.000	0.375
Σ PUFA	60.82 \pm 1.67	65.55 \pm 2.25	69.83 \pm 1.88	84.50 \pm 2.58	86.29 \pm 4.98	81.66 \pm 2.17	0.441	0.000	0.112
Σ HUFA	26.58 \pm 1.60	30.89 \pm 1.12	33.38 \pm 2.50	62.71 \pm 1.62	64.27 \pm 3.03	62.40 \pm 1.52	0.225	0.000	0.224
I. Insat.	233 \pm 8	259 \pm 8	278 \pm 12	398 \pm 10	407 \pm 22	391 \pm 10	0.264	0.000	0.130
Total (AG)	109 \pm 3	111 \pm 4	119 \pm 3	129 \pm 5	129 \pm 10	121 \pm 4	0.971	0.006	0.257

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados.

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XVIII. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	1.0 \pm 0.06	0.8 \pm 0.06	1.0 \pm 0.09	0.6 \pm 0.05	0.6 \pm 0.03	0.7 \pm 0.06	0.119	0.000	0.156
16:0	9.8 \pm 0.34 ^{ab}	8.7 \pm 0.07 ^b	10.2 \pm 0.31 ^a	9.2 \pm 0.37 ^{ab}	8.9 \pm 0.27 ^{ab}	8.8 \pm 0.37 ^b	0.044	0.018	0.046
18:0	7.5 \pm 0.29	8.9 \pm 0.22	8.6 \pm 0.17	7.9 \pm 0.32	8.0 \pm 0.21	8.2 \pm 0.38	0.022	0.196	0.073
16:1(n-9)	0.9 \pm 0.04	0.8 \pm 0.04	0.9 \pm 0.08	0.8 \pm 0.06	0.9 \pm 0.03	0.9 \pm 0.07	0.740	0.628	0.043
16:1(n-7)	1.1 \pm 0.07	0.9 \pm 0.08	1.1 \pm 0.03	1.0 \pm 0.08	1.1 \pm 0.08	0.8 \pm 0.12	0.488	0.343	0.052
18:1(n-9)	10.1 \pm 0.35 ^a	8.1 \pm 0.34 ^b	9.8 \pm 0.32 ^a	7.1 \pm 0.35 ^{bc}	6.5 \pm 0.31 ^c	6.3 \pm 0.43 ^c	0.003	0.000	0.036
18:1(n-7)	2.8 \pm 0.18	2.9 \pm 0.15	3.1 \pm 0.15	3.0 \pm 0.11	3.0 \pm 0.15	2.6 \pm 0.16	0.922	0.886	0.066
18:2(n-6)	15.6 \pm 0.60	13.6 \pm 0.62	14.3 \pm 0.61	11.6 \pm 0.33	11.1 \pm 0.42	10.7 \pm 0.33	0.053	0.000	0.302
18:3(n-3)	1.1 \pm 0.06	1.1 \pm 0.07	0.9 \pm 0.07	0.8 \pm 0.09	0.7 \pm 0.08	0.8 \pm 0.05	0.355	0.000	0.310
20:1(n-9)	1.2 \pm 0.05	1.3 \pm 0.02	1.2 \pm 0.06	1.3 \pm 0.04	1.4 \pm 0.08	1.2 \pm 0.05	0.022	0.273	0.362
20:2(n-6)	2.2 \pm 0.09	2.6 \pm 0.12	2.2 \pm 0.06	2.3 \pm 0.18	2.2 \pm 0.15	2.6 \pm 0.23	0.532	0.925	0.060
20:4(n-6)	5.9 \pm 0.25	6.5 \pm 0.31	5.9 \pm 0.10	5.2 \pm 0.46	5.5 \pm 0.30	6.0 \pm 0.37	0.391	0.060	0.248
20:5(n-3)	18.6 \pm 0.79	20.5 \pm 0.81	18.3 \pm 0.54	23.1 \pm 0.54	24.0 \pm 0.47	24.0 \pm 0.81	0.124	0.000	0.295
21:5(n-3)	1.3 \pm 0.22	1.0 \pm 0.24	1.6 \pm 0.10	1.1 \pm 0.29	1.0 \pm 0.25	0.8 \pm 0.06	0.569	0.061	0.233
22:5(n-6)	0.6 \pm 0.04 ^b	1.5 \pm 0.36 ^a	0.6 \pm 0.11 ^b	0.5 \pm 0.10 ^b	0.5 \pm 0.12 ^b	0.9 \pm 0.06 ^{ab}	0.058	0.084	0.009
22:5(n-3)	1.1 \pm 0.06	1.0 \pm 0.07	1.1 \pm 0.13	1.5 \pm 0.13	1.2 \pm 0.09	1.6 \pm 0.15	0.140	0.000	0.238
22:6(n-3)	12.5 \pm 0.37	13.9 \pm 0.58	12.9 \pm 0.50	17.0 \pm 0.45	17.1 \pm 0.31	16.3 \pm 0.19	0.103	0.000	0.253
Σ SAT.	20.4 \pm 0.41	20.2 \pm 0.23	22.0 \pm 0.43	19.8 \pm 0.36	19.7 \pm 0.28	20.1 \pm 0.13	0.012	0.001	0.127
Σ MONO	17.1 \pm 0.39 ^a	14.9 \pm 0.23 ^{bc}	16.9 \pm 0.43 ^{ab}	14.2 \pm 0.37 ^c	13.7 \pm 0.28 ^c	12.8 \pm 0.18 ^c	0.032	0.000	0.021
Σ PUFA	61.7 \pm 0.61 ^b	64.2 \pm 0.68 ^a	60.5 \pm 0.53 ^b	65.4 \pm 0.72 ^a	66.0 \pm 0.42 ^a	66.3 \pm 0.53 ^a	0.015	0.000	0.010
Σ HUFA	41.4 \pm 1.10	45.8 \pm 1.06	41.6 \pm 1.14	49.6 \pm 0.81	50.5 \pm 0.77	50.8 \pm 0.64	0.028	0.000	0.064
(n-3)/(n-6)	1.4 \pm 0.06	1.6 \pm 0.07	1.5 \pm 0.07	2.2 \pm 0.05	2.2 \pm 0.07	2.1 \pm 0.03	0.184	0.000	0.456
22:6/20:5	0.7 \pm 0.04	0.7 \pm 0.03	0.7 \pm 0.01	0.7 \pm 0.03	0.7 \pm 0.02	0.7 \pm 0.03	0.859	0.340	0.354
I. Insat.	271 \pm 4 ^c	288 \pm 6 ^b	269 \pm 5 ^c	305 \pm 3 ^a	310 \pm 3 ^a	308 \pm 2 ^a	0.016	0.000	0.048

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Inst.: Índice de insaturación.

Tabla XIX. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.66 \pm 0.05	0.94 \pm 0.32	0.67 \pm 0.08	0.47 \pm 0.05	0.46 \pm 0.05	0.53 \pm 0.05	0.636	0.041	0.496
16:0	6.52 \pm 0.27	9.51 \pm 2.53	7.05 \pm 0.45	7.34 \pm 0.54	6.70 \pm 0.87	6.37 \pm 0.37	0.479	0.386	0.322
18:0	5.00 \pm 0.29	9.53 \pm 2.34	5.92 \pm 0.36	6.27 \pm 0.40	5.93 \pm 0.66	5.95 \pm 0.32	0.135	0.410	0.084
16:1(n-9)	0.62 \pm 0.02	0.89 \pm 0.29	0.62 \pm 0.09	0.64 \pm 0.04	0.70 \pm 0.08	0.67 \pm 0.07	0.446	0.743	0.640
16:1(n-7)	0.72 \pm 0.06	1.05 \pm 0.39	0.74 \pm 0.05	0.79 \pm 0.07	0.80 \pm 0.12	0.59 \pm 0.10	0.389	0.481	0.680
18:1(n-9)	6.70 \pm 0.29	8.93 \pm 2.55	6.72 \pm 0.23	5.69 \pm 0.45	4.85 \pm 0.62	4.55 \pm 0.33	0.594	0.021	0.417
18:1(n-7)	1.83 \pm 0.13	3.23 \pm 1.03	2.16 \pm 0.18	2.39 \pm 0.13	2.29 \pm 0.33	1.93 \pm 0.14	0.288	0.615	0.308
20:1(n-9)	0.77 \pm 0.04	1.40 \pm 0.36	0.83 \pm 0.08	1.02 \pm 0.07	1.01 \pm 0.12	0.84 \pm 0.05	0.089	0.768	0.180
18:2(n-6)	10.38 \pm 0.67	14.69 \pm 3.59	9.84 \pm 0.45	9.16 \pm 0.37	8.33 \pm 0.98	7.79 \pm 0.28	0.297	0.030	0.267
18:3(n-3)	0.75 \pm 0.05	1.21 \pm 0.40	0.63 \pm 0.05	0.62 \pm 0.09	0.54 \pm 0.09	0.56 \pm 0.03	0.333	0.074	0.233
20:2(n-6)	1.48 \pm 0.10	2.80 \pm 0.63	1.54 \pm 0.08	1.86 \pm 0.17	1.62 \pm 0.13	1.85 \pm 0.12	0.136	0.512	0.023
20:4(n-6)	3.90 \pm 0.13	7.31 \pm 2.33	4.05 \pm 0.29	4.11 \pm 0.32	4.03 \pm 0.44	4.35 \pm 0.36	0.240	0.304	0.177
20:5(n-3)	12.37 \pm 0.61	21.59 \pm 4.81	12.66 \pm 0.96	18.31 \pm 0.72	17.80 \pm 1.95	17.42 \pm 0.54	0.105	0.247	0.093
21:5(n-3)	0.88 \pm 0.14	1.31 \pm 0.61	1.12 \pm 0.12	0.88 \pm 0.20	0.74 \pm 0.16	0.57 \pm 0.04	0.819	0.141	0.560
22:5(n-6)	0.41 \pm 0.03 ^b	1.37 \pm 0.27 ^a	0.43 \pm 0.06 ^b	0.40 \pm 0.06 ^b	0.37 \pm 0.06 ^b	0.64 \pm 0.04 ^b	0.004	0.020	0.000
22:5(n-3)	0.72 \pm 0.02	1.11 \pm 0.27	0.72 \pm 0.05	1.21 \pm 0.14	0.92 \pm 0.14	1.17 \pm 0.11	0.890	0.059	0.063
22:6(n-3)	8.30 \pm 0.10	14.81 \pm 3.42	8.94 \pm 0.76	13.52 \pm 0.70	12.77 \pm 1.52	11.83 \pm 0.40	0.120	0.163	0.104
Σ SAT.	13.57 \pm 0.55	21.99 \pm 5.77	15.16 \pm 0.95	15.74 \pm 0.91	14.69 \pm 1.73	14.58 \pm 0.47	0.320	0.405	0.206
Σ MONO	11.35 \pm 0.46	16.60 \pm 4.90	11.68 \pm 0.60	11.28 \pm 0.76	10.27 \pm 1.21	9.33 \pm 0.57	0.431	0.133	0.373
Σ POLY	40.92 \pm 1.26	68.89 \pm 16.65	41.74 \pm 2.51	51.83 \pm 1.58	49.00 \pm 5.11	48.15 \pm 1.02	0.160	0.895	0.115
Σ HUFA	27.45 \pm 0.72	48.92 \pm 11.71	28.78 \pm 2.10	39.29 \pm 1.17	37.46 \pm 3.97	36.92 \pm 1.02	0.127	0.539	0.091
I. Insat.	180 \pm 5	308 \pm 74	186 \pm 12	242 \pm 8	229 \pm 25	224 \pm 5	0.151	0.818	0.111
Total (AG)	66 \pm 2	108 \pm 28	69 \pm 4	79 \pm 3	74 \pm 8	73 \pm 2	0.230	0.592	0.165

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XX. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.77 \pm 0.03	0.83 \pm 0.06	0.79 \pm 0.07	0.36 \pm 0.03	0.41 \pm 0.04	0.44 \pm 0.04	0.466	0.000	0.733
16:0	15.78 \pm 0.23	15.43 \pm 0.21	15.70 \pm 0.33	15.53 \pm 0.24	15.91 \pm 0.49	14.89 \pm 0.36	0.443	0.467	0.162
18:0	11.30 \pm 0.34	11.66 \pm 0.26	11.42 \pm 0.24	11.35 \pm 0.27	10.90 \pm 0.40	11.32 \pm 0.26	0.956	0.291	0.374
16:1(n-9)	0.37 \pm 0.02	0.35 \pm 0.03	0.40 \pm 0.03	0.40 \pm 0.05	0.44 \pm 0.03	0.38 \pm 0.06	0.930	0.329	0.363
16:1(n-7)	1.31 \pm 0.07	1.24 \pm 0.06	1.39 \pm 0.09	1.03 \pm 0.08	1.24 \pm 0.16	0.94 \pm 0.08	0.681	0.004	0.070
18:1(n-9)	13.71 \pm 0.10 ^a	12.24 \pm 0.16 ^b	13.47 \pm 0.25 ^a	9.06 \pm 0.27 ^c	8.87 \pm 0.21 ^c	8.83 \pm 0.26 ^c	0.003	0.000	0.009
18:1(n-7)	3.39 \pm 0.19	3.44 \pm 0.05	3.66 \pm 0.15	3.51 \pm 0.15	3.70 \pm 0.20	3.26 \pm 0.11	0.700	0.967	0.089
18:2(n-6)	18.94 \pm 0.96	17.83 \pm 0.69	19.38 \pm 1.20	12.01 \pm 0.13	11.69 \pm 0.24	10.88 \pm 0.22	0.603	0.000	0.251
18:3(n-3)	1.11 \pm 0.07	1.05 \pm 0.05	1.13 \pm 0.10	0.60 \pm 0.04	0.55 \pm 0.07	0.60 \pm 0.07	0.638	0.000	0.986
20:1(n-9)	1.16 \pm 0.05	1.33 \pm 0.05	1.13 \pm 0.05	1.32 \pm 0.03	1.38 \pm 0.04	1.44 \pm 0.03	0.034	0.000	0.021
20:2(n-6)	1.72 \pm 0.07	1.74 \pm 0.10	1.67 \pm 0.15	2.03 \pm 0.15	1.80 \pm 0.09	1.98 \pm 0.11	0.700	0.027	0.465
20:4(n-6)	4.00 \pm 0.27	3.94 \pm 0.28	3.45 \pm 0.24	3.84 \pm 0.22	4.04 \pm 0.23	4.38 \pm 0.23	0.947	0.168	0.093
20:5(n-3)	13.20 \pm 0.45	13.53 \pm 0.43	12.05 \pm 0.45	19.78 \pm 0.53	19.28 \pm 0.64	20.54 \pm 0.20	0.913	0.000	0.022
22:5(n-3)	0.81 \pm 0.11	0.97 \pm 0.11	0.80 \pm 0.11	1.10 \pm 0.09	1.25 \pm 0.14	1.07 \pm 0.07	0.220	0.004	0.996
22:6(n-3)	8.05 \pm 0.37	10.38 \pm 0.51	9.19 \pm 0.71	13.70 \pm 0.68	13.57 \pm 0.52	14.16 \pm 0.26	0.126	0.000	0.078
Σ SAT.	29.34 \pm 0.43	29.42 \pm 0.17	29.31 \pm 0.44	28.87 \pm 0.36	28.95 \pm 0.57	28.40 \pm 0.27	0.684	0.066	0.806
Σ MONO	20.77 \pm 0.25	19.47 \pm 0.11	20.91 \pm 0.16	16.18 \pm 0.30	16.60 \pm 0.30	15.78 \pm 0.23	0.179	0.000	0.000
Σ PUFA	49.50 \pm 0.48	50.82 \pm 0.24	49.41 \pm 0.53	54.64 \pm 0.34	54.08 \pm 0.78	55.44 \pm 0.41	0.693	0.000	0.029
Σ HUFA	26.75 \pm 1.08	29.32 \pm 0.99	26.29 \pm 1.34	39.10 \pm 0.31	38.81 \pm 0.73	40.90 \pm 0.35	0.445	0.000	0.027
(n-3)/(n-6)	0.92 \pm 0.05	1.09 \pm 0.07	0.93 \pm 0.08	1.90 \pm 0.03	1.91 \pm 0.09	2.02 \pm 0.05	0.376	0.000	0.138
22:6/20:5	0.61 \pm 0.02	0.77 \pm 0.03	0.76 \pm 0.05	0.70 \pm 0.05	0.70 \pm 0.02	0.69 \pm 0.01	0.041	0.565	0.039
I. Insat.	205 \pm 4	216 \pm 4	205 \pm 5	253 \pm 2	251 \pm 4	259 \pm 2	0.392	0.000	0.029

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XXI. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma aguda.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.52 \pm 0.04	0.91 \pm 0.27	0.94 \pm 0.35	0.30 \pm 0.04	0.30 \pm 0.01	0.46 \pm 0.14	0.314	0.010	0.570
16:0	10.60 \pm 0.88	16.46 \pm 3.87	21.11 \pm 9.91	13.01 \pm 1.35	11.90 \pm 1.27	14.80 \pm 2.88	0.413	0.458	0.608
18:0	7.61 \pm 0.73	12.22 \pm 2.53	15.12 \pm 6.87	9.48 \pm 0.87	8.23 \pm 0.99	11.44 \pm 2.48	0.344	0.469	0.598
16:1(n-9)	0.25 \pm 0.03	0.39 \pm 0.12	0.57 \pm 0.29	0.33 \pm 0.05	0.33 \pm 0.04	0.38 \pm 0.12	0.423	0.630	0.637
16:1(n-7)	0.86 \pm 0.04	1.35 \pm 0.37	1.97 \pm 1.01	0.88 \pm 0.13	0.92 \pm 0.16	0.93 \pm 0.18	0.451	0.199	0.510
18:1(n-9)	9.22 \pm 0.78	12.90 \pm 2.79	17.59 \pm 7.86	7.62 \pm 0.87	6.72 \pm 0.81	8.86 \pm 1.84	0.390	0.069	0.599
18:1(n-7)	2.24 \pm 0.10	3.69 \pm 0.91	5.12 \pm 2.53	2.96 \pm 0.36	2.78 \pm 0.36	3.22 \pm 0.60	0.401	0.464	0.522
20:1(n-9)	0.77 \pm 0.05	1.40 \pm 0.29	1.51 \pm 0.70	1.10 \pm 0.10	1.04 \pm 0.13	1.43 \pm 0.28	0.307	0.903	0.605
18:2(n-6)	12.85 \pm 1.57	18.74 \pm 4.06	23.78 \pm 9.43	10.10 \pm 1.13	8.86 \pm 1.11	10.88 \pm 2.21	0.418	0.026	0.503
18:3(n-3)	0.75 \pm 0.08	1.07 \pm 0.17	1.38 \pm 0.55	0.51 \pm 0.08	0.44 \pm 0.09	0.66 \pm 0.23	0.331	0.020	0.614
20:2(n-6)	1.15 \pm 0.09	1.84 \pm 0.43	2.08 \pm 0.85	1.72 \pm 0.27	1.37 \pm 0.19	2.04 \pm 0.54	0.398	0.959	0.539
20:4(n-6)	2.65 \pm 0.18	4.46 \pm 1.46	5.18 \pm 2.85	3.18 \pm 0.29	2.98 \pm 0.26	4.40 \pm 0.93	0.405	0.613	0.760
20:5(n-3)	8.88 \pm 0.78	14.44 \pm 3.37	16.79 \pm 8.32	16.58 \pm 1.73	14.76 \pm 2.02	20.86 \pm 4.73	0.363	0.262	0.696
22:5(n-3)	0.56 \pm 0.10	1.05 \pm 0.27	1.25 \pm 0.71	0.94 \pm 0.14	0.90 \pm 0.10	1.05 \pm 0.19	0.490	0.968	0.629
22:6(n-3)	5.39 \pm 0.44	10.97 \pm 2.42	12.86 \pm 6.32	11.63 \pm 1.64	10.44 \pm 1.53	14.29 \pm 3.11	0.298	0.369	0.557
Σ SAT.	19.99 \pm 1.72	31.54 \pm 7.16	39.48 \pm 18.16	24.41 \pm 2.34	21.96 \pm 2.32	28.90 \pm 6.05	0.376	0.456	0.619
Σ MONO	13.92 \pm 1.04	20.72 \pm 4.80	28.03 \pm 13.08	13.61 \pm 1.50	12.48 \pm 1.40	15.79 \pm 3.23	0.391	0.164	0.597
Σ PUFA	33.35 \pm 2.95	54.08 \pm 12.50	65.82 \pm 30.28	46.01 \pm 5.18	41.17 \pm 5.32	56.28 \pm 12.71	0.356	0.788	0.645
Σ HUFA	17.95 \pm 1.51	31.47 \pm 7.65	37.23 \pm 18.80	32.91 \pm 3.66	29.59 \pm 3.88	41.58 \pm 9.47	0.340	0.458	0.669
I. Insat.	138 \pm 11	230 \pm 54	279 \pm 133	213 \pm 24	191 \pm 25	263 \pm 59	0.347	0.905	0.653
Total (AG)	67 \pm 6	106 \pm 25	133 \pm 62	84 \pm 9	76 \pm 9	101 \pm 22	0.367	0.521	0.636

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XXII. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	2.85 \pm 0.11	3.46 \pm 0.32	3.32 \pm 0.09	0.75 \pm 0.04	0.59 \pm 0.02	0.66 \pm 0.03	0.284	0.000	0.038
16:0	19.14 \pm 0.47	20.91 \pm 0.42	20.80 \pm 0.22	14.67 \pm 0.25	14.04 \pm 0.07	14.91 \pm 0.11	0.012	0.000	0.002
18:0	5.18 \pm 0.19	4.85 \pm 0.09	5.29 \pm 0.31	4.09 \pm 0.37	4.61 \pm 0.39	4.51 \pm 0.14	0.631	0.004	0.310
16:1(n-7)	3.43 \pm 0.16	4.09 \pm 0.26	4.40 \pm 0.20	2.46 \pm 0.21	2.10 \pm 0.09	2.54 \pm 0.08	0.021	0.000	0.017
18:1(n-9)	22.04 \pm 0.72	23.16 \pm 0.36	22.32 \pm 0.34	12.59 \pm 0.15	12.45 \pm 0.32	12.55 \pm 0.10	0.418	0.000	0.254
18:1(n-7)	4.89 \pm 0.29	4.68 \pm 0.26	5.40 \pm 0.17	3.65 \pm 0.10	3.40 \pm 0.13	4.19 \pm 0.17	0.003	0.000	0.986
18:2(n-6)	19.72 \pm 0.63	21.72 \pm 0.91	21.99 \pm 0.49	20.64 \pm 0.32	20.01 \pm 0.61	20.55 \pm 0.30	0.189	0.129	0.062
18:3(n-3)	1.84 \pm 0.12	2.14 \pm 0.09	2.16 \pm 0.05	2.09 \pm 0.08	1.88 \pm 0.08	1.98 \pm 0.07	0.467	0.360	0.014
20:1(n-9)	1.11 \pm 0.03	1.20 \pm 0.07	1.15 \pm 0.04	1.86 \pm 0.09	2.08 \pm 0.05	1.96 \pm 0.05	0.035	0.000	0.568
20:2(n-6)	1.89 \pm 0.05	1.63 \pm 0.17	1.51 \pm 0.04	2.28 \pm 0.22	2.32 \pm 0.20	1.83 \pm 0.06	0.022	0.001	0.408
20:4(n-6)	1.61 \pm 0.25 ^a	0.91 \pm 0.14 ^b	0.97 \pm 0.11 ^b	1.08 \pm 0.09 ^{ab}	1.32 \pm 0.16 ^{ab}	1.10 \pm 0.04 ^{ab}	0.106	0.986	0.012
20:5(n-3)	4.34 \pm 0.76	2.16 \pm 0.32	2.21 \pm 0.27	10.64 \pm 0.37	10.54 \pm 0.55	9.94 \pm 0.07	0.009	0.000	0.077
22:5(n-3)	0.49 \pm 0.06	0.35 \pm 0.05	0.29 \pm 0.02	1.95 \pm 0.06	2.13 \pm 0.06	1.99 \pm 0.07	0.174	0.000	0.022
22:6(n-3)	4.19 \pm 0.63 ^c	3.01 \pm 0.39 ^{cd}	2.26 \pm 0.19 ^d	11.50 \pm 0.38 ^b	14.12 \pm 0.26 ^a	12.52 \pm 0.30 ^{ab}	0.018	0.000	0.000
Σ SAT.	28.78 \pm 0.41	30.74 \pm 0.55	30.95 \pm 0.17	21.57 \pm 0.25	21.09 \pm 0.45	22.01 \pm 0.31	0.008	0.000	0.011
Σ MONO	33.40 \pm 1.21	34.82 \pm 0.47	35.11 \pm 0.60	23.84 \pm 0.34	23.35 \pm 0.53	24.51 \pm 0.26	0.200	0.000	0.350
Σ PUFA	37.82 \pm 1.31	34.44 \pm 0.92	33.94 \pm 0.60	54.59 \pm 0.40	55.56 \pm 0.16	53.48 \pm 0.49	0.010	0.000	0.025
Σ HUFA	11.73 \pm 1.63	7.18 \pm 0.92	6.50 \pm 0.59	27.08 \pm 0.78	29.77 \pm 0.83	27.27 \pm 0.32	0.039	0.000	0.002
(n-3)/(n-6)	0.48 \pm 0.06	0.33 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	1.12 \pm 0.05	1.23 \pm 0.06	1.14 \pm 0.02	0.155	0.000	0.014
22:6/20:5	0.98 \pm 0.03	1.42 \pm 0.10	1.04 \pm 0.04	1.08 \pm 0.01	1.35 \pm 0.05	1.26 \pm 0.04	0.000	0.067	0.036
I. Insat.	149 \pm 7 ^b	130 \pm 4 ^c	126 \pm 2 ^c	226 \pm 3 ^a	238 \pm 2 ^a	227 \pm 2 ^a	0.018	0.000	0.001

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Tabla XXIII. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	19.36 \pm 2.60	25.30 \pm 5.10	23.86 \pm 1.94	4.16 \pm 0.43	3.26 \pm 0.27	3.73 \pm 0.13	0.565	0.000	0.377
16:0	128.7 \pm 14.2	147.7 \pm 16.5	151.5 \pm 16.4	80.4 \pm 5.7	78.6 \pm 7.8	85.1 \pm 2.6	0.513	0.000	0.636
18:0	34.29 \pm 2.63	34.15 \pm 3.84	37.97 \pm 3.69	21.93 \pm 0.91	25.11 \pm 1.34	25.72 \pm 0.86	0.326	0.000	0.747
16:1(n-7)	23.33 \pm 3.12	28.82 \pm 3.34	32.39 \pm 4.40	13.68 \pm 1.78	11.90 \pm 1.64	14.50 \pm 0.73	0.222	0.000	0.290
18:1(n-9)	149.1 \pm 18.34	164.4 \pm 2.82	162.6 \pm 17.8	68.8 \pm 4.19	70.4 \pm 8.76	71.7 \pm 2.72	0.793	0.000	0.878
18:1(n-7)	32.80 \pm 3.96	32.61 \pm 2.68	39.52 \pm 4.91	20.05 \pm 1.63	19.16 \pm 2.38	23.94 \pm 1.37	0.134	0.000	0.893
20:1(n-9)	7.37 \pm 0.7	8.39 \pm 0.81	8.43 \pm 0.99	10.11 \pm 0.46	11.77 \pm 1.46	11.19 \pm 0.36	0.286	0.000	0.918
18:2(n-6)	133.8 \pm 17.7	154.9 \pm 22.2	159.2 \pm 15.4	113.3 \pm 8.6	112.7 \pm 13.1	117.3 \pm 3.9	0.597	0.008	0.703
18:3(n-3)	12.65 \pm 2.02	15.23 \pm 2.22	15.76 \pm 1.80	11.53 \pm 1.13	10.63 \pm 1.35	11.31 \pm 0.50	0.670	0.017	0.486
20:2(n-6)	12.68 \pm 1.38	11.22 \pm 1.00	10.93 \pm 1.13	12.48 \pm 1.63	13.45 \pm 2.45	10.51 \pm 0.68	0.409	0.662	0.619
20:4(n-6)	10.25 \pm 0.94	6.02 \pm 0.46	6.73 \pm 0.31	5.82 \pm 0.30	7.10 \pm 0.37	6.25 \pm 0.26	0.007	0.004	0.000
20:5(n-3)	27.58 \pm 3.14	14.40 \pm 0.98	15.36 \pm 0.84	57.95 \pm 2.87	58.06 \pm 3.91	56.73 \pm 1.64	0.020	0.000	0.031
22:5(n-3)	3.20 \pm 0.30	2.34 \pm 0.18	2.09 \pm 0.11	10.69 \pm 0.73	12.08 \pm 1.53	11.37 \pm 0.65	0.819	0.000	0.312
22:6(n-3)	26.92 \pm 2.88	20.16 \pm 1.81	15.88 \pm 0.75	62.68 \pm 3.33	78.72 \pm 7.20	71.65 \pm 3.72	0.302	0.000	0.012
Σ SAT.	177.1 \pm 17.9	196.0 \pm 21.2	205.3 \pm 21.2	116.0 \pm 6.4	116.0 \pm 9.7	124.0 \pm 3.3	0.496	0.000	0.760
Σ MONO	231.0 \pm 27.7	247.0 \pm 27.5	256.5 \pm 29.5	135.5 \pm 10.1	132.6 \pm 16.2	141.8 \pm 5.0	0.760	0.000	0.878
Σ PUFA	243.0 \pm 23.2	237.3 \pm 23.9	240.0 \pm 19.9	292.0 \pm 18.4	308.4 \pm 30.6	301.7 \pm 11.0	0.970	0.002	0.881
Σ HUFA	75.3 \pm 6.6	48.0 \pm 2.2	45.7 \pm 2.1	147.8 \pm 8.1	165.3 \pm 13.7	155.9 \pm 6.2	0.380	0.000	0.015
I. Insat.	992 \pm 81	906 \pm 73	911 \pm 76	1243 \pm 75	1332 \pm 127	1297 \pm 49	0.979	0.000	0.554
Total (AG)	651 \pm 66	679 \pm 72	701 \pm 70	543 \pm 35	556 \pm 56	567 \pm 18	0.804	0.014	0.973

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Inst.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XXIV. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.70 \pm 0.06	0.77 \pm 0.06	0.63 \pm 0.04	0.24 \pm 0.02	0.24 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01	0.219	0.000	0.236
16:0	11.55 \pm 0.35	11.53 \pm 0.35	11.28 \pm 0.23	10.54 \pm 0.36	10.16 \pm 0.36	10.43 \pm 0.22	0.788	0.000	0.711
18:0	7.74 \pm 0.30	7.33 \pm 0.42	7.68 \pm 0.14	7.71 \pm 0.26	7.18 \pm 0.32	7.46 \pm 0.22	0.284	0.584	0.953
16:1(n-7)	1.55 \pm 0.04	2.00 \pm 0.12	2.07 \pm 0.10	0.99 \pm 0.10	0.95 \pm 0.02	1.00 \pm 0.02	0.009	0.000	0.007
18:1(n-9)	12.74 \pm 0.30	14.48 \pm 0.21	13.49 \pm 0.30	7.35 \pm 0.11	7.04 \pm 0.19	6.94 \pm 0.02	0.012	0.000	0.001
18:1(n-7)	3.24 \pm 0.13	3.23 \pm 0.18	3.66 \pm 0.07	3.00 \pm 0.16	2.58 \pm 0.04	3.06 \pm 0.07	0.004	0.000	0.199
20:1(n-9)	0.88 \pm 0.01	1.05 \pm 0.05	1.03 \pm 0.02	1.24 \pm 0.06	1.35 \pm 0.04	1.35 \pm 0.02	0.002	0.000	0.720
18:2(n-6)	22.90 \pm 0.99	27.69 \pm 1.05	28.22 \pm 0.68	10.71 \pm 0.17	12.01 \pm 0.51	10.94 \pm 0.20	0.001	0.000	0.009
18:3(n-3)	2.18 \pm 0.12	2.85 \pm 0.13	2.91 \pm 0.08	0.88 \pm 0.04	0.91 \pm 0.06	0.82 \pm 0.04	0.001	0.000	0.001
20:2(n-6)	2.03 \pm 0.05	2.05 \pm 0.12	1.85 \pm 0.05	2.32 \pm 0.15	2.67 \pm 0.15	2.35 \pm 0.08	0.063	0.000	0.324
20:4(n-6)	4.11 \pm 0.24	3.46 \pm 0.13	4.00 \pm 0.16	3.11 \pm 0.27	3.14 \pm 0.11	3.25 \pm 0.04	0.126	0.000	0.153
20:5(n-3)	12.06 \pm 0.86	8.36 \pm 0.25	9.24 \pm 0.48	24.52 \pm 1.01	22.64 \pm 0.67	23.65 \pm 0.28	0.001	0.000	0.271
22:5(n-3)	0.85 \pm 0.03	0.67 \pm 0.04	0.71 \pm 0.04	1.93 \pm 0.09	1.86 \pm 0.11	1.83 \pm 0.05	0.140	0.000	0.673
22:6(n-3)	10.74 \pm 0.65	9.05 \pm 0.41	7.35 \pm 0.49	18.62 \pm 0.30	21.56 \pm 0.61	20.82 \pm 0.37	0.076	0.000	0.000
Σ SAT.	21.52 \pm 0.52	20.98 \pm 0.69	21.07 \pm 0.24	20.18 \pm 0.44	19.13 \pm 0.69	19.67 \pm 0.39	0.345	0.002	0.874
Σ MONO	19.75 \pm 0.41	22.09 \pm 0.37	21.65 \pm 0.44	14.23 \pm 0.29	13.43 \pm 0.28	13.90 \pm 0.02	0.060	0.000	0.001
Σ PUFA	58.73 \pm 0.62	56.93 \pm 0.97	57.28 \pm 0.49	65.59 \pm 0.61	67.44 \pm 0.94	66.43 \pm 0.40	0.886	0.000	0.062
Σ HUFA	29.43 \pm 1.55	22.71 \pm 0.39	22.53 \pm 1.11	49.63 \pm 0.84	50.41 \pm 1.39	50.85 \pm 0.36	0.023	0.000	0.002
(n-3)/(n-6)	0.89 \pm 0.07	0.64 \pm 0.02	0.60 \pm 0.03	2.79 \pm 0.05	2.60 \pm 0.13	2.78 \pm 0.02	0.015	0.000	0.131
22:6/20:5	0.89 \pm 0.01	1.09 \pm 0.07	0.79 \pm 0.03	0.76 \pm 0.04	0.95 \pm 0.01	0.88 \pm 0.02	0.000	0.076	0.014
I. Insat.	235 \pm 6	213 \pm 2	210 \pm 4	311 \pm 3	319 \pm 6	318 \pm 2	0.158	0.000	0.003

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Tabla XXV. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de hepatopáncreas de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.72 \pm 0.07	0.88 \pm 0.08	0.66 \pm 0.07	0.32 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	0.303	0.000	0.093
16:0	11.72 \pm 0.78	13.18 \pm 0.94	11.90 \pm 0.74	13.83 \pm 1.52	11.47 \pm 0.92	13.24 \pm 0.20	0.885	0.447	0.106
18:0	7.93 \pm 0.78	8.41 \pm 0.80	8.15 \pm 0.66	10.12 \pm 1.20	8.13 \pm 0.75	9.49 \pm 0.35	0.607	0.108	0.292
16:1(n-7)	1.57 \pm 0.13	2.28 \pm 0.20	2.20 \pm 0.20	1.28 \pm 0.15	1.07 \pm 0.07	1.27 \pm 0.05	0.128	0.000	0.019
18:1(n-9)	12.96 \pm 0.95	16.49 \pm 0.83	14.22 \pm 0.90	9.57 \pm 0.78	7.98 \pm 0.67	8.82 \pm 0.19	0.455	0.000	0.012
18:1(n-7)	3.32 \pm 0.34	3.71 \pm 0.33	3.87 \pm 0.28	3.94 \pm 0.44	2.91 \pm 0.18	3.89 \pm 0.14	0.181	0.824	0.082
20:1(n-9)	0.89 \pm 0.06	1.19 \pm 0.08	1.09 \pm 0.06	1.64 \pm 0.21	1.52 \pm 0.11	1.72 \pm 0.04	0.419	0.000	0.134
18:2(n-6)	23.25 \pm 1.78	31.35 \pm 0.90	29.68 \pm 1.56	13.96 \pm 1.18	13.57 \pm 1.17	13.90 \pm 0.33	0.017	0.000	0.010
18:3(n-3)	2.22 \pm 0.21	3.23 \pm 0.12	3.06 \pm 0.18	1.15 \pm 0.11	1.04 \pm 0.11	1.05 \pm 0.06	0.015	0.000	0.002
20:2(n-6)	2.07 \pm 0.18	2.33 \pm 0.17	1.95 \pm 0.12	3.03 \pm 0.37	3.02 \pm 0.27	2.99 \pm 0.16	0.647	0.000	0.697
20:4(n-6)	4.20 \pm 0.43	3.96 \pm 0.29	4.24 \pm 0.37	4.01 \pm 0.36	3.51 \pm 0.11	4.13 \pm 0.10	0.320	0.346	0.860
20:5(n-3)	12.16 \pm 0.84	9.48 \pm 0.30	9.82 \pm 0.99	31.83 \pm 2.56	25.48 \pm 1.56	30.10 \pm 1.06	0.008	0.000	0.225
22:5(n-3)	0.87 \pm 0.07	0.76 \pm 0.03	0.75 \pm 0.08	2.53 \pm 0.28	2.11 \pm 0.21	2.34 \pm 0.11	0.223	0.000	0.557
22:6(n-3)	10.86 \pm 0.74	10.34 \pm 0.78	7.79 \pm 0.81	24.36 \pm 2.39	24.26 \pm 1.47	26.45 \pm 0.62	0.924	0.000	0.091
Σ SAT.	21.92 \pm 1.67	24.01 \pm 1.82	22.29 \pm 1.58	26.49 \pm 2.91	21.63 \pm 1.80	24.99 \pm 0.58	0.747	0.290	0.161
Σ MONO	20.12 \pm 1.57	25.20 \pm 1.47	22.86 \pm 1.51	18.58 \pm 1.71	15.19 \pm 1.17	17.67 \pm 0.43	0.778	0.000	0.021
Σ PUFA	59.59 \pm 3.62	64.63 \pm 2.10	60.48 \pm 3.87	85.46 \pm 7.19	75.94 \pm 4.43	84.48 \pm 2.30	0.820	0.000	0.171
Σ HUFA	29.81 \pm 2.11	25.86 \pm 1.33	23.91 \pm 2.27	64.63 \pm 5.46	56.72 \pm 3.38	64.67 \pm 1.78	0.141	0.000	0.246
I. Insat.	238 \pm 14	242 \pm 10	223 \pm 16	405 \pm 35	359 \pm 21	404 \pm 11	0.537	0.000	0.211
Total (AG)	102 \pm 7	114 \pm 5	106 \pm 7	131 \pm 12	113 \pm 7	127 \pm 3	0.889	0.010	0.105

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XXVI. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	1.2 \pm 0.14	1.1 \pm 0.09	1.2 \pm 0.08	0.6 \pm 0.02	0.6 \pm 0.04	0.7 \pm 0.05	0.864	0.000	0.974
16:0	10.8 \pm 1.09	10.8 \pm 0.91	10.5 \pm 0.46	8.6 \pm 0.83	9.4 \pm 0.56	9.1 \pm 0.15	0.836	0.010	0.829
18:0	8.3 \pm 0.32	8.7 \pm 0.15	8.7 \pm 0.27	8.6 \pm 0.20	8.3 \pm 0.20	8.7 \pm 0.27	0.540	0.780	0.364
16:1(n-9)	1.1 \pm 0.08	1.1 \pm 0.19	1.4 \pm 0.22	1.2 \pm 0.10	1.0 \pm 0.12	1.4 \pm 0.17	0.174	0.878	0.827
16:1(n-7)	1.1 \pm 0.17	1.2 \pm 0.27	1.1 \pm 0.17	0.7 \pm 0.11	0.9 \pm 0.06	0.9 \pm 0.05	0.573	0.035	0.846
18:1(n-9)	10.0 \pm 1.04	9.8 \pm 1.06	8.9 \pm 0.61	5.7 \pm 0.19	6.7 \pm 0.40	6.4 \pm 0.14	0.649	0.000	0.485
18:1(n-7)	2.7 \pm 0.16	2.8 \pm 0.31	2.8 \pm 0.21	2.5 \pm 0.22	2.9 \pm 0.15	3.1 \pm 0.10	0.314	0.716	0.593
20:1(n-9)	1.3 \pm 0.04	1.4 \pm 0.14	1.4 \pm 0.03	1.4 \pm 0.04	1.3 \pm 0.07	1.2 \pm 0.04	0.956	0.585	0.378
18:2(n-6)	14.3 \pm 0.81	15.9 \pm 0.38	15.4 \pm 0.36	9.7 \pm 0.31	11.4 \pm 0.34	10.7 \pm 0.25	0.007	0.000	0.980
18:3(n-3)	1.1 \pm 0.06	1.2 \pm 0.05	1.1 \pm 0.09	0.7 \pm 0.06	0.7 \pm 0.05	0.7 \pm 0.03	0.526	0.000	0.442
20:2(n-6)	2.2 \pm 0.13	2.4 \pm 0.21	2.4 \pm 0.04	2.6 \pm 0.28	2.4 \pm 0.26	2.4 \pm 0.04	0.982	0.309	0.411
20:4(n-6)	6.1 \pm 0.51	5.5 \pm 0.50	5.9 \pm 0.17	4.9 \pm 0.55	5.0 \pm 0.23	5.4 \pm 0.18	0.644	0.033	0.666
20:5(n-3)	19.1 \pm 1.13	17.6 \pm 1.35	18.2 \pm 0.89	26.8 \pm 1.08	25.0 \pm 0.54	24.8 \pm 0.38	0.202	0.000	0.821
21:5(n-3)	1.1 \pm 0.54	1.4 \pm 0.23	1.5 \pm 0.37	1.2 \pm 0.32	1.1 \pm 0.21	1.2 \pm 0.31	0.861	0.637	0.834
22:5(n-6)	0.65 \pm 0.08	0.63 \pm 0.16	0.71 \pm 0.16	0.98 \pm 0.26	0.34 \pm 0.05	0.42 \pm 0.06	0.069	0.446	0.057
22:5(n-3)	0.9 \pm 0.15	1.1 \pm 0.06	1.0 \pm 0.11	1.5 \pm 0.23	1.1 \pm 0.11	1.1 \pm 0.07	0.708	0.052	0.100
22:6(n-3)	11.4 \pm 0.83	11.5 \pm 0.83	11.3 \pm 0.38	15.5 \pm 0.34	16.3 \pm 0.57	16.1 \pm 0.54	0.807	0.000	0.783
Σ SAT.	22.5 \pm 0.81	22.6 \pm 0.91	22.6 \pm 0.47	20.5 \pm 1.08	20.4 \pm 0.61	21.0 \pm 0.54	0.889	0.004	0.911
Σ MONO	17.1 \pm 1.23	17.3 \pm 1.62	16.6 \pm 0.99	12.4 \pm 0.51	13.6 \pm 0.50	13.7 \pm 0.29	0.785	0.000	0.673
Σ PUFA	59.7 \pm 1.92	59.4 \pm 2.44	60.1 \pm 1.40	66.3 \pm 1.50	65.4 \pm 1.06	64.6 \pm 0.64	0.899	0.000	0.783
Σ HUFA	40.6 \pm 2.63	38.7 \pm 2.56	39.9 \pm 1.66	51.9 \pm 1.64	49.8 \pm 0.86	49.5 \pm 0.65	0.546	0.000	0.887
(n-3)/(n-6)	1.4 \pm 0.09	1.3 \pm 0.07	1.4 \pm 0.06	2.5 \pm 0.02	2.3 \pm 0.05	2.3 \pm 0.05	0.077	0.000	0.616
22:6/20:5	0.6 \pm 0.02	0.7 \pm 0.04	0.6 \pm 0.03	0.6 \pm 0.01	0.7 \pm 0.02	0.6 \pm 0.02	0.043	0.975	0.641
I. de Insat.	263 \pm 11	258 \pm 11	262 \pm 7	311 \pm 7	305 \pm 5	302 \pm 3	0.737	0.000	0.888

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Tabla XXVII. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos neutros de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.71 \pm 0.11	0.80 \pm 0.10	1.33 \pm 0.46	0.45 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	0.46 \pm 0.04	0.263	0.008	0.284
16:0	6.50 \pm 0.84	7.65 \pm 1.07	11.46 \pm 3.59	6.03 \pm 0.47	6.72 \pm 0.27	6.26 \pm 0.35	0.301	0.117	0.301
18:0	4.92 \pm 0.22	6.02 \pm 0.29	9.51 \pm 3.03	6.12 \pm 0.49	6.02 \pm 0.53	5.96 \pm 0.42	0.243	0.480	0.205
16:1(n-9)	0.67 \pm 0.07	0.79 \pm 0.15	1.48 \pm 0.49	0.86 \pm 0.11	0.71 \pm 0.05	0.94 \pm 0.13	0.090	0.438	0.292
16:1(n-7)	0.64 \pm 0.12	0.89 \pm 0.25	1.20 \pm 0.36	0.50 \pm 0.07	0.65 \pm 0.08	0.64 \pm 0.05	0.248	0.065	0.543
18:1(n-9)	6.02 \pm 0.80	6.95 \pm 1.12	9.50 \pm 2.68	4.02 \pm 0.21	4.80 \pm 0.21	4.36 \pm 0.21	0.355	0.007	0.398
18:1(n-7)	1.61 \pm 0.11	1.96 \pm 0.33	3.10 \pm 1.00	1.78 \pm 0.15	2.07 \pm 0.13	2.10 \pm 0.13	0.163	0.531	0.364
20:1(n-9)	0.76 \pm 0.01	0.96 \pm 0.15	1.49 \pm 0.47	0.97 \pm 0.03	0.94 \pm 0.11	0.86 \pm 0.05	0.358	0.413	0.158
18:2(n-6)	8.58 \pm 0.75	11.07 \pm 0.74	16.50 \pm 4.99	6.81 \pm 0.27	8.26 \pm 0.71	7.31 \pm 0.34	0.187	0.018	0.206
18:3(n-3)	0.66 \pm 0.06	0.85 \pm 0.07	1.12 \pm 0.26	0.52 \pm 0.02	0.51 \pm 0.07	0.45 \pm 0.03	0.293	0.001	0.106
20:2(n-6)	1.29 \pm 0.09	1.67 \pm 0.17	2.65 \pm 0.85	1.85 \pm 0.22	1.80 \pm 0.30	1.66 \pm 0.08	0.339	0.773	0.160
20:4(n-6)	3.58 \pm 0.27	3.78 \pm 0.28	6.40 \pm 2.06	3.55 \pm 0.55	3.68 \pm 0.39	3.66 \pm 0.16	0.240	0.221	0.263
20:5(n-3)	11.33 \pm 0.61	12.04 \pm 0.64	20.37 \pm 7.27	19.10 \pm 1.83	18.25 \pm 1.72	17.00 \pm 0.80	0.470	0.199	0.203
21:5(n-3)	0.63 \pm 0.28	0.96 \pm 0.19	1.90 \pm 0.97	0.83 \pm 0.18	0.82 \pm 0.13	0.81 \pm 0.21	0.373	0.364	0.354
22:5(n-6)	0.39 \pm 0.05	0.44 \pm 0.12	0.78 \pm 0.32	0.71 \pm 0.22	0.24 \pm 0.02	0.29 \pm 0.05	0.384	0.369	0.071
22:5(n-3)	0.55 \pm 0.11	0.77 \pm 0.05	1.24 \pm 0.53	1.02 \pm 0.15	0.80 \pm 0.04	0.76 \pm 0.05	0.582	0.974	0.168
22:6(n-3)	6.82 \pm 0.60	7.93 \pm 0.61	12.96 \pm 4.95	11.00 \pm 0.80	11.94 \pm 1.27	11.00 \pm 0.46	0.392	0.266	0.304
Σ SAT.	13.88 \pm 0.84	16.33 \pm 1.47	25.91 \pm 8.8	14.94 \pm 0.43	15.14 \pm 0.8	14.95 \pm 1.27	0.278	0.252	0.270
Σ MONO	10.24 \pm 1.04	12.23 \pm 1.83	17.85 \pm 5.30	8.77 \pm 0.51	9.76 \pm 0.45	9.44 \pm 0.48	0.254	0.051	0.323
Σ PUFA	35.48 \pm 1.59	41.02 \pm 1.72	66.76 \pm 23.13	47.15 \pm 3.58	47.68 \pm 4.42	44.25 \pm 1.74	0.354	0.868	0.211
Σ HUFA	24.08 \pm 1.51	26.63 \pm 1.48	45.10 \pm 16.65	36.93 \pm 3.16	36.30 \pm 3.36	33.94 \pm 1.32	0.415	0.536	0.228
I. Insat.	157 \pm 8	178 \pm 8	293 \pm 104	221 \pm 17	222 \pm 20	207 \pm 8	0.377	0.842	0.223
Total (AG)	60 \pm 3	70 \pm 4	111 \pm 37	71 \pm 4	73 \pm 6	69 \pm 3	0.310	0.494	0.230

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XXVIII. Proporción (%) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ppm) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.61 \pm 0.04	0.74 \pm 0.06	0.75 \pm 0.06	0.30 \pm 0.04	0.35 \pm 0.05	0.35 \pm 0.03	0.098	0.000	0.520
16:0	14.78 \pm 0.28	15.77 \pm 0.48	15.27 \pm 0.17	14.32 \pm 0.33	14.62 \pm 0.49	14.90 \pm 0.12	0.149	0.026	0.465
18:0	11.12 \pm 0.21	11.33 \pm 0.16	11.22 \pm 0.22	10.80 \pm 0.16	10.60 \pm 0.19	10.33 \pm 0.18	0.517	0.000	0.305
16:1(n-9)	0.33 \pm 0.04	0.27 \pm 0.01	0.37 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02	0.36 \pm 0.04	0.057	0.624	0.546
16:1(n-7)	1.27 \pm 0.05	1.44 \pm 0.09	1.61 \pm 0.12	0.91 \pm 0.06	1.06 \pm 0.05	1.12 \pm 0.05	0.004	0.000	0.673
18:1(n-9)	13.19 \pm 0.31	13.37 \pm 0.28	12.57 \pm 0.36	7.87 \pm 0.27	8.30 \pm 0.12	8.07 \pm 0.12	0.160	0.000	0.283
18:1(n-7)	3.57 \pm 0.15	3.43 \pm 0.07	3.63 \pm 0.18	3.42 \pm 0.09	3.40 \pm 0.10	3.93 \pm 0.16	0.027	0.718	0.225
20:1(n-9)	1.42 \pm 0.08	1.48 \pm 0.04	1.56 \pm 0.09	1.48 \pm 0.09	1.48 \pm 0.06	1.47 \pm 0.07	0.663	0.925	0.580
18:2(n-6)	18.92 \pm 0.56	21.85 \pm 0.54	20.71 \pm 0.45	10.52 \pm 0.32	11.78 \pm 0.41	11.42 \pm 0.11	0.000	0.000	0.166
18:3(n-3)	0.99 \pm 0.18	1.58 \pm 0.09	1.25 \pm 0.10	0.63 \pm 0.04	0.65 \pm 0.03	0.55 \pm 0.09	0.016	0.000	0.031
20:2(n-6)	1.71 \pm 0.09	1.87 \pm 0.10	1.90 \pm 0.18	2.23 \pm 0.09	2.17 \pm 0.14	2.06 \pm 0.14	0.916	0.005	0.370
20:4(n-6)	4.16 \pm 0.20	3.21 \pm 0.10	3.90 \pm 0.15	3.68 \pm 0.22	3.91 \pm 0.18	4.06 \pm 0.13	0.042	0.375	0.006
20:5(n-3)	13.68 \pm 0.54	11.31 \pm 0.43	12.74 \pm 0.50	23.10 \pm 0.53	21.20 \pm 0.30	21.03 \pm 0.24	0.000	0.000	0.194
22:5(n-3)	0.88 \pm 0.07	0.73 \pm 0.11	0.81 \pm 0.17	1.15 \pm 0.06	1.02 \pm 0.11	1.18 \pm 0.15	0.436	0.004	0.900
22:6(n-3)	9.35 \pm 0.47	8.27 \pm 0.56	8.31 \pm 0.34	15.27 \pm 0.47	15.45 \pm 0.49	15.71 \pm 0.33	0.607	0.000	0.232
Σ SAT.	28.19 \pm 0.12	29.27 \pm 0.48	28.73 \pm 0.31	27.23 \pm 0.42	27.29 \pm 0.57	27.17 \pm 0.11	0.341	0.000	0.406
Σ MONO	20.43 \pm 0.38	20.62 \pm 0.35	20.41 \pm 0.65	14.66 \pm 0.19	15.21 \pm 0.06	15.44 \pm 0.29	0.509	0.000	0.566
Σ PUFA	51.38 \pm 0.43	50.11 \pm 0.66	50.85 \pm 0.86	58.11 \pm 0.55	57.51 \pm 0.59	57.39 \pm 0.35	0.301	0.000	0.756
Σ HUFA	28.61 \pm 1.09	24.12 \pm 1.09	26.37 \pm 1.02	43.59 \pm 0.85	42.15 \pm 0.76	42.47 \pm 0.38	0.011	0.000	0.247
(n-3)/(n-6)	0.99 \pm 0.04	0.80 \pm 0.04	0.85 \pm 0.04	2.40 \pm 0.11	2.08 \pm 0.06	2.13 \pm 0.03	0.001	0.000	0.492
22:6/20:5	0.68 \pm 0.03	0.73 \pm 0.03	0.65 \pm 0.02	0.66 \pm 0.02	0.73 \pm 0.02	0.75 \pm 0.02	0.081	0.239	0.047
I. Insat.	215 \pm 4	199 \pm 5	206 \pm 4	274 \pm 4	268 \pm 4	269 \pm 2	0.039	0.000	0.412

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.

Tabla XXIX. Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de ácidos grasos (media \pm E.E.) en la fracción de lípidos polares de las branquias de organismos alimentados con un alimento enriquecido con 0 y 50% PUFA y expuestos a tres salinidades (5, 30 y 50 ups) de forma crónica.

	0%			50%			S	A	S x A
	5 ups	30 ups	50 ups	5 ups	30 ups	50 ups			
14:0	0.47 \pm 0.03	0.61 \pm 0.04	1.20 \pm 0.59	0.30 \pm 0.04	0.31 \pm 0.03	0.33 \pm 0.03	0.263	0.034	0.327
16:0	11.48 \pm 0.94	13.07 \pm 0.54	22.92 \pm 9.78	14.10 \pm 0.92	13.47 \pm 1.03	14.63 \pm 1.19	0.284	0.603	0.384
18:0	8.73 \pm 0.98	9.45 \pm 0.63	16.79 \pm 7.05	10.69 \pm 0.87	9.77 \pm 0.67	10.21 \pm 1.03	0.346	0.562	0.332
16:1(n-9)	0.27 \pm 0.05	0.23 \pm 0.02	0.54 \pm 0.21	0.32 \pm 0.05	0.29 \pm 0.03	0.35 \pm 0.04	0.133	0.797	0.318
16:1(n-7)	0.99 \pm 0.10	1.21 \pm 0.12	2.57 \pm 1.21	0.91 \pm 0.13	0.96 \pm 0.04	1.12 \pm 0.12	0.184	0.162	0.346
18:1(n-9)	10.28 \pm 0.97	11.10 \pm 0.48	19.22 \pm 8.41	7.72 \pm 0.41	7.68 \pm 0.65	7.93 \pm 0.66	0.363	0.055	0.400
18:1(n-7)	2.77 \pm 0.22	2.85 \pm 0.17	5.51 \pm 2.35	3.41 \pm 0.37	3.13 \pm 0.21	3.88 \pm 0.39	0.179	0.774	0.484
20:1(n-9)	1.09 \pm 0.09	1.23 \pm 0.07	2.29 \pm 0.91	1.48 \pm 0.19	1.35 \pm 0.07	1.46 \pm 0.16	0.241	0.742	0.279
18:2(n-6)	14.76 \pm 1.46	18.15 \pm 0.87	30.22 \pm 12.01	10.36 \pm 0.71	10.93 \pm 1.07	11.25 \pm 1.01	0.253	0.020	0.320
18:3(n-3)	0.78 \pm 0.18	1.31 \pm 0.09	1.79 \pm 0.65	0.62 \pm 0.04	0.60 \pm 0.04	0.52 \pm 0.09	0.285	0.005	0.170
20:2(n-6)	1.36 \pm 0.19	1.56 \pm 0.13	2.54 \pm 0.83	2.21 \pm 0.18	1.98 \pm 0.11	2.04 \pm 0.26	0.312	0.416	0.209
20:4(n-6)	3.26 \pm 0.36	2.68 \pm 0.21	5.66 \pm 2.27	3.61 \pm 0.28	3.60 \pm 0.26	3.96 \pm 0.29	0.200	0.854	0.375
20:5(n-3)	10.69 \pm 1.13	9.42 \pm 0.66	19.05 \pm 8.20	23.05 \pm 2.56	19.58 \pm 1.45	20.75 \pm 1.97	0.356	0.013	0.329
22:5(n-3)	0.70 \pm 0.10	0.60 \pm 0.08	0.98 \pm 0.26	1.14 \pm 0.13	0.93 \pm 0.11	1.16 \pm 0.18	0.166	0.019	0.697
22:6(n-3)	7.37 \pm 0.95	6.95 \pm 0.80	12.10 \pm 4.87	15.29 \pm 1.78	14.32 \pm 1.27	15.40 \pm 1.28	0.378	0.003	0.557
Σ SAT.	22.02 \pm 2.11	24.32 \pm 1.16	43.10 \pm 18.32	26.88 \pm 1.95	25.13 \pm 1.75	26.74 \pm 2.32	0.316	0.575	0.356
Σ MONO	15.90 \pm 1.40	17.13 \pm 0.81	31.04 \pm 13.40	14.48 \pm 1.08	14.03 \pm 0.99	15.21 \pm 1.36	0.294	0.149	0.382
Σ PUFA	40.22 \pm 4.16	41.76 \pm 2.62	74.18 \pm 29.84	57.80 \pm 5.65	53.14 \pm 4.08	56.42 \pm 4.81	0.322	0.725	0.354
Σ HUFA	22.44 \pm 2.56	20.16 \pm 1.79	38.70 \pm 15.96	43.48 \pm 4.68	38.94 \pm 2.96	41.73 \pm 3.56	0.332	0.022	0.406
I. Insat.	168 \pm 18	166 \pm 12	303 \pm 124	272 \pm 28	248 \pm 19	265 \pm 23	0.331	0.274	0.380
Total (AG)	78 \pm 8	83 \pm 5	148 \pm 62	99 \pm 9	92 \pm 7	98 \pm 9	0.313	0.758	0.359

Mismo pie de tabla que en la XIV.

SAT: Saturados

PUFA: Con dos o más dobles enlaces.

HUFA: Con cuatro o más dobles enlaces.

I. Insta.: Índice de insaturación.

Total (AG): Total de ácidos grasos.