

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CARACTERIZACION FISIOLÓGICA E INMUNOLÓGICA DE UNA POBLACION DE MACHOS ADULTOS DEL CAMARON BLANCO LITOPENAEUS SETIFERUS (LINNEO, 1767): LINEA BASE Y EFECTO DEL ESTRES TERMICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGIA GENERAL)

PRESENTA:

CRISTINA PASCUAL JIMENEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS ROSAS VAZQUEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO FRANCISCO VARGAS ALBORES

MEXICO, D. F.

ABRIL 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| HIPÓTESIS | 8 |
| OBJETIVO GENERAL | 8 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 8 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 9 |
| ORIGEN DE LOS ORGANISMOS | 9 |
| I. LÍNEA BASE | 9 |
| EVALUACIONES INMUNOLÓGICAS, BIOQUÍMICO FISIOLÓGICAS Y REPRODUCTIVAS | 11 |
| 1. EVALUACIONES INMUNOLÓGICA | 11 |
| 2. EVALUACIONES BIOQUÍMICO FISIOLÓGICAS | 12 |
| 3. EVALUACIONES REPRODUCTIVAS | 14 |
| II. ORGANISMOS MANTENIDOS EN CAUTIVERIO | 15 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 17 |
| RESULTADOS | 19 |
| I. LÍNEA BASE | 19 |
| A) ESTADO DE MUDA | 19 |
| B) PARÁMETROS REPRODUCTIVOS | 20 |
| C) COMPONENTES DE LA HEMOLINFA | 22 |
| D) ANÁLISIS DE CORRELACIONES | 23 |
| II. ORGANISMOS MANTENIDOS EN CAUTIVERIO | 26 |
| A) ESTADO DE MUDA | 26 |
| B) PARÁMETROS REPRODUCTIVOS | 27 |
| C) COMPONENTES DE LA HEMOLINFA | 29 |
| D) ANÁLISIS DE CORRELACIONES | 34 |
| DISCUSIÓN | 36 |
| I. LÍNEA BASE | 36 |
| II. ORGANISMOS MANTENIDOS EN CAUTIVERIO | 46 |
| CONCLUSIONES | 59 |
| LITERATURA CITADA | 60 |
| ANEXOS | 70 |

Resumen

La producción masiva de nauplios de *Litopenaeus setiferus* no ha sido reportada hasta ahora. El síndrome de degeneración y el síndrome de melanización del tracto reproductivo de los machos han sido considerados como las principales razones, debido a la marcada reducción de la calidad espermática que experimenta los machos en cautiverio. Diversas investigaciones ponen en evidencia que ambos síndromes pueden ser relacionados al estrés de cautiverio y de manejo, viéndose afectados el sistema inmune y el estado fisiológico de los camarones. En el presente estudio se caracterizó a una población de machos de *L. setiferus* recién capturados a partir de evaluaciones fisiológicas (capacidad osmótica, concentración de glucosa, lactato, proteínas, colesterol, triacilglicéridos y calcio en la hemolinfa), evaluaciones del sistema inmune (actividad de la fenoloxidasa, conteo y caracterización de los hemocitos) y evaluaciones reproductivas (calidad espermática y contenido de glucógeno en los componentes del espermátóforo). Al comparar la calidad espermática y las evaluaciones del sistema inmune de los machos provenientes de diferentes capturas no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$). Las capturas se realizaron durante los meses del segundo pico anual reproductivo de la especie (septiembre a noviembre). El seguimiento de 24 horas de los componentes de la hemolinfa de los machos recién capturados reveló que la concentración de lactato y de los triacilglicéridos fueron significativamente mayores en las últimas horas del ciclo. La concentración de glucosa de machos provenientes de diferentes capturas no presentó diferencia significativa ($P > 0.05$), a diferencia de la concentración de proteínas, de colesterol y de calcio ($P < 0.05$).

Los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días, estuvieron expuestos a 33 °C para acelerar las alteraciones frecuentemente observadas en los machos mantenidos en cautiverio por mayor tiempo (aproximadamente 2 a 3 semanas). El efecto del cautiverio se determinó a partir de las mismas evaluaciones realizadas para caracterizar a la población de machos recién capturados. El peso de los organismos disminuyó significativamente a lo largo de la prueba a pesar de que el consumo de alimento se vio incrementado ($P < 0.05$). El seguimiento diario de los componentes de la hemolinfa revelaron la participación de mecanismos compensatorios, la concentración de glucosa, proteínas y triacilglicéridos en la hemolinfa fueron restablecidos en un 70 % para el día 10 del experimento, mientras que los niveles de colesterol y de calcio no lograron ser compensados, mostrando diferencias significativas a partir del día 3 con el valor inicial. El conteo de hemocitos disminuyó significativamente en el día 6 pero los niveles también fueron compensados. En la actividad de fenoloxidasa se observó un patrón de comportamiento sin diferencia significativa durante el transcurso del experimento. La concentración de triacilglicéridos y de colesterol en los machos recién capturados y en los mantenidos en cautiverio estuvo relacionada a la condición reproductiva de los machos adultos de *L. setiferus*, revelando su posible uso como indicador del estado reproductivo.

Los resultados revelan que en los organismos recién capturados y bajo condiciones de cautiverio, las variaciones de los metabolitos son consistentes con las variaciones de la respuesta inmune y con la calidad reproductiva de los machos de *L. setiferus*, lo cual refleja su posible utilización como herramienta de diagnóstico para determinar el estado fisiológica de los camarones.

Introducción

En la actualidad los recursos marinos juegan un papel importante en la economía y la política internacional. Además de la explotación natural se ha desarrollado una sofisticada tecnología para sostener la producción acuícola. Específicamente el cultivo de camarón se ha planteado como una alternativa a la disminución de la pesca en altamar, adquiriendo especial relevancia en el suministro de grandes cantidades del producto a un mercado mundial en crecimiento

México ocupa el segundo lugar en el cultivo del camarón en el continente Americano. No obstante, la producción de camarón en el país aun no satisface la demanda nacional por lo cual la industria camaronícola tiene un alto potencial de crecimiento (W.S.F., 1998). Para poder incrementar la producción de camarón cultivado, es necesario resolver una serie de problemas asociados a la reproducción, a las enfermedades, a la obtención de "semilla" o postlarvas de buena calidad y las condiciones climáticas extremas.

El camarón blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus* (antes *Penaeus setiferus*) es una de las especies de camarones importantes del Atlántico de América. Esta especie se distribuye desde el sur de Nueva York hasta la Península de Yucatán (Muncy, 1984).

La información biológico pesquera de los últimos años y la experiencia generada por la industria del cultivo de camarón a nivel mundial permite ver al camarón blanco *L. setiferus* como una especie potencial para el desarrollo de esta actividad en el Golfo de México. Estudios recientes han demostrado que postlarvas de *L. setiferus* crecen adecuadamente en sistemas de cultivo intensivo produciendo rendimientos de entre 5 y 6 Ton/Ha/cosecha (Sandifer *et al.*, 1993). Si bien estos cultivos han llamado la atención con respecto al potencial acuícola de la especie, existen numerosas interrogantes referentes a las distintas etapas de su sistema de producción. Aunque *L. setiferus* tiene un crecimiento más lento que *L. vannamei*, éste es menos sensible a las enfermedades virales. Además, el cultivo de *L. setiferus* presenta una ventaja desde el punto de vista ecológico ya que siendo una especie nativa no representa ningún riesgo ambiental como en el caso de *L. vannamei* que es una especie nativa de la costa oeste del Océano Pacífico y por lo tanto introducida para el Golfo de México. Sin embargo, la falta de

laboratorios de producción de postlarvas de *L. setiferus* impide el desarrollo comercial de la camaricultura en el Golfo de México a partir de esta especie (Sandifer *et al.*, 1993).

Muchas de los laboratorios de producción de postlarvas dependen de la obtención de los reproductores de las poblaciones naturales o de la captura de postlarvas del medio natural. Esto limita los ciclos de engorda de las granjas camarícolas a mantenerse sujetos a la disponibilidad de los recursos, además de representar problemas económicos y ambientales. Es así, que la expansión de la industria camarícola depende del adecuado conocimiento de los procesos de maduración y de reproducción para lograr un adecuado abastecimiento de postlarvas, el cual debe de garantizar una tasa de producción de nauplios que satisfaga la demanda creada.

Los esfuerzos para inducir la maduración gonadal en peneidos se ha centrado principalmente en las hembras, la cual en muchas de las especies se logra por medio de la ablación del tallo ocular. Este procedimiento se basa en eliminar la hormona inhibidora de la gónada, generando un incremento en la frecuencia de desoves (Primavera, 1985; Bray y Lawrence, 1992). Con respecto a los machos, se ha observado que su calidad reproductiva se ve drásticamente disminuida después de ser mantenidos por unas semanas en cautiverio. A *L. setiferus* se le considera como una especie particularmente susceptible al deterioro de la calidad reproductiva en condiciones de cautiverio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1991).

Aunque desde hace más de 50 años se cuenta con la descripción de la biología reproductiva de *L. setiferus* (King, 1948), los mecanismos relacionados con su maduración y los procesos reproductivos han sido investigados muy recientemente. La anatomía del sistema reproductivo de los machos, se compone de dos estructuras pareadas: testículo y vaso deferente (Anexo 1), este último está dividido en cuatro regiones: sección proximal, porción media, porción distal y una región muscular altamente dilatada llamada ámpula terminal en el cual se termina de formar el espermátforo (Anexo 2). El tólico de la hembra en el caso de *L. setiferus* es abierto, por lo cual la fertilización de los huevos se encuentra estrechamente relacionada con la adecuada transferencia y adherencia del espermátforo, ya que los espermatozoides son transportados y protegidos por esta estructura. El espermátforo es expulsado del ámpula terminal a través del gonoporo. Durante el proceso de expulsión ambas mitades se ensamblan fuera del cuerpo formando un espermátforo completo, con estructuras que le facilitan el anclaje sobre la superficie del tólico de la hembra (King, 1948; Ro *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1991; Krol *et al.*, 1992).

La maduración gonádica de los peneidos es inducida por factores endocrinos, nutricionales y ambientales. En el caso de los machos, la unidad endócrina encargada del desarrollo y mantenimiento de las características sexuales masculinas y de la actividad espermatogénica, es la glándula androgénica (Alfaro, 1994). La maduración de los machos incluye dos aspectos, el funcional o la capacidad de copular con los órganos sexuales secundarios completos y el aspecto fisiológico, o la capacidad del esperma de fertilizar los huevos. Los machos están funcionalmente maduros cuando las estructuras accesorias en el primer par de pleópodos se juntan para formar el petasma. En los machos de *L. setiferus* los endopoditos del segundo par de pleópodos, tienen una ligera modificación, el ápice masculino, la cual también podría ayudar en la manipulación del espermátforo durante la transferencia al tético de la hembra (King, 1948).

El espermatozoide esta compuesto de tres partes: la cabeza o cuerpo esferoidal, la pieza media y la cola o "spike". En el caso de los decápodos natatia el espermatozoide es uniestelar y la reacción del acrosoma en la interacción espermatozoide-huevo es bifásica (Clark *et al.*, 1981), para *Litopenaeus occidentalis* los espermatozoides experimentan la unión primaria con la envoltura vitelina del huevo, pero no se activa la reacción acrosomal, por esta razón se considera que existen diferencias aun no comprendidas entre los mecanismos de fertilización de los camarones de tético abierto y cerrado (Alfaro, 1993).

La trasferencia del espermátforo es el paso final de una serie de eventos que comprenden el comportamiento de cópula en los decápodos, la cual es afectada por factores ambientales, como la temperatura, la salinidad, la profundidad de la columna de agua, la intensidad y el fotoperíodo. Así como por factores biológicos tales como la densidad, la razón de sexos en los tanques de las unidades de maduración y la viabilidad de los reproductores (Adiyodi, 1985; Yano *et al.*, 1988; Pérez y Ramos, 1992).

Desde el primer reporte sobre la maduración y desove exitoso de *L. setiferus* bajo condiciones de laboratorio se registró la dificultad de los machos para transferir el espermátforo, la cual fue relacionada con una infección bacteriana (Brown *et al.*, 1979). Muchos estudios se han realizado con el fin de dilucidar las posibles causas del deterioro de la calidad reproductiva de los camarones machos. Este fenómeno fue definido como "síndrome degenerativo del aparato reproductivo de los machos" (SDARM), y se caracteriza por una progresiva disminución del número de células espermáticas y un aumento en el porcentaje de células anormales y muertas (Chamberlain *et al.*, 1983). Este síndrome y el de melanización

(oscurecimiento) del sistema reproductivo de los machos (SMAR) fueron asociados a una misma enfermedad (Bray *et al.*, 1985; Talbot *et al.*, 1989). Ahora se considera que la melanización y la degeneración del espermátforo son dos procesos diferentes (Alfaro, 1990). La melanización u oscurecimiento del aparato genital se debe a la producción de melanina generada por uno de los mecanismos de defensa más importante de los camarones, el sistema profenoloxidasa, el cual es activado por una infección bacteriana (Ashida y Söderhäll, 1984; Talbot *et al.*, 1989; Alfaro, 1993). El síndrome de degeneración ha sido correlacionado con problemas de naturaleza endócrina asociados con el estrés del cautiverio (Alfaro, 1990).

En ambos síndromes se ha observado una dramática disminución de la calidad espermática y por lo tanto el potencial reproductivo de los organismos es afectando sensiblemente. Debido a la falta de conocimientos sobre la fisiología reproductiva de los camarones machos, existen numerosas interrogantes acerca de cual o cuales de los mecanismos fisiológicos involucrados en la reproducción pudieran alterarse como consecuencias del estrés generado por las condiciones de cautiverio, afectando así la calidad espermática.

A la fecha no existe literatura en la cual se reporten desoves masivos obtenidos mediante cópula natural en *L. setiferus* (Weidner *et al.*, 1992). Esto ha obligado a algunos productores al uso de la inseminación artificial como una forma continua de obtener nauplios, aún cuando, en la mayoría de los casos, los machos estimulados para la obtención de la masa espermática deban ser eliminados debido al marcado deterioro de los espermátforos después de la electroestimulación (Rosas *et al.*, 1993; Pascual *et al.*, 1998). Aunque el tiempo de degeneración de los espermátforos de los machos es muy corto (aproximadamente de 2 a 3 semanas), los centros de desove que operan mayormente con inseminación artificial se ven obligados a un recambio continuo de machos con el consecuente aumento en los costos de operación. En éste sentido, conocer parte de los procesos fisiológicos involucrados en los procesos de maduración en machos, podrían significar beneficios a los laboratorios de producción.

Aunque en general se recomiendan temperaturas entre 28 y 29 °C para los sistemas de maduración de los camarones peneidos (Zein-Eldin, 1986; Pratoomchat *et al.*, 1993; Robertson *et al.*, 1993). Se ha demostrado que temperaturas menores a éstas retardan la degeneración de los espermátforos de *L. setiferus* (Bray *et al.*, 1985). En los machos adultos de *L. setiferus* mantenidos a 30 °C por 30 días se observaron síntomas intermedios y avanzados de melanización, la observación de estructuras melanizadas en etapas avanzadas mostró que el proceso de oscurecimiento se confina a la superficie del tejido en el

ámpula terminal y en los lóbulos de los testículos (Pascual *et al.*, 1998). Estas observaciones concuerdan con Chamberlain *et al.* (1983); Alfaro (1990); Alfaro (1993), en donde se ha demostrado que la infección por bacterias oportunistas (*Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas putrefaciens* y una especie no identificada) está asociada con la presencia del síndrome de melanización.

Los resultados de las investigaciones anteriores revelan que existe una relación entre la melanización, la degeneración y la temperatura. Puesto que la respuesta inmune de los camarones está implicada con el SMAR, es posible asumir que temperaturas mayores de 27 °C afectan los mecanismos de defensa, tal vez alterando los procesos involucrados en la producción de células fagocíticas (Fontaine y Lightner, 1974), de otros factores antibacteriales tales como aglutininas no-específicas (Lewis y Lawrence, 1983), y/o alterando la regulación del sistema de la profenoloxidasas (proFO) (Le Moullac *et al.*, 1997), generando a su vez una mayor susceptibilidad a la invasión de patógenos oportunistas.

El establecimiento de una enfermedad no sólo se debe únicamente a la presencia o al incremento de los patógenos, sino que también depende de la condición fisiológica de los animales. La modificación de los parámetros ambientales como temperatura y salinidad, pueden incrementar la susceptibilidad de los animales hacia algunas infecciones (Vargas-Albores *et al.*, 1998). Para llegar a un diagnóstico oportuno y preciso, se requiere conocer los componentes del sistema inmune de la especie en cuestión y la influencia de los parámetros ambientales sobre los mecanismos de defensa.

Como parte del sistema inmune de los crustáceos se han descritos varios factores: (a) proteínas séricas como las aglutininas (Vargas-Albores *et al.*, 1992) (b) procesos celulares ejecutados por los hemocitos, como fagocitosis, adhesión y encapsulación (Söderhäll, 1982; Söderhäll *et al.*, 1990; Vargas-Albores, 1995); (c) sistemas multiméricos como la coagulación y el sistema profenoloxidasas (proFO) (Söderhäll, 1992; Guzmán-Murillo *et al.*, 1993; Vargas-Albores *et al.*, 1997).

El sistema proFO es una compleja cascada enzimática que se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos y puede ser liberado por estimulación con beta-glucanos o lipopolisacáridos (PLS) de hongos y bacterias. Una vez liberado el contenido granular, la proFO es activada por una preteína en fenoloxidasas (FO), la cual es responsable de la oxidación de fenoles a quinonas, y se convierten en melanina (Ashida y Söderhäll, 1984). El sistema proFO al activarse genera algunos factores que estimulan a los hemocitos a eliminar el material extraño (Söderhäll *et al.*, 1984; Söderhäll *et al.*, 1988).

Aun cuando no se tiene claridad en cuanto a lo que potencializa ambos fenómenos; diferentes autores han podido constatar que el estrés producido por la eyacuación artificial, una técnica empleada para la inseminación artificial, ha sido asociada con la degeneración de los espermátóforos (Chamberlain *et al.*, 1983; Sandifer *et al.*, 1984; Harris y Sandifer, 1986; Dougherty y Dougherty, 1989; Leung-Trujillo y Lawrence, 1991). El síndrome de degeneración ha sido asociado a una desaparición parcial o total de las secreciones glandulares en el ámpula y éstas secreciones a su vez se consideran responsables del mantenimiento de la matriz que mantiene vivos a los espermatozoides (Talbot *et al.*, 1989), por lo cual se podría especular que estas glándulas son particularmente sensible a temperaturas mayores de 27 °C. El síndrome de degeneración ha sido retrasado utilizando temperaturas menores de 27 °C por lo que temperaturas entre 25-26 °C se han recomendado para mantener machos sanos en los centros de desove de camarón, por lo menos durante 30 días (Bray *et al.*, 1985).

En organismos poiquiloterms como los camarones, los eventos fisiológicos y bioquímicos están regidos por los cambios de la temperatura. La actividad del sistema inmune, la capacidad de responder adecuadamente al ambiente circundante y la capacidad regenerativa de los tejidos son afectados por la temperatura. La regeneración del espermátóforo a 33 °C se desarrolla en menor tiempo que a temperaturas menores (144 h), sin embargo el total de células viables disminuye casi 10 veces con respecto al obtenido en los animales recién capturados, por lo cual 33 °C se considera como una temperatura extrema que afecta sensiblemente la calidad espermática de los camarones en cautiverio (Bray *et al.*, 1985; Pascual *et al.*, 1998). En un estudio reciente Vargas-Albores *et al.* (1998) demostraron que tanto la temperatura como la salinidad afectaron el sistema inmune del camarón *Farfantepenaeus (Penaeus) californiensis*. Estos autores reportaron que a temperaturas de 32 °C la actividad de la proFO se deprime, lo cual coincidió con un aumento de la concentración de las proteínas del plasma. Estos resultados demuestran que el sistema inmune, al igual que la fisiología general de los organismos esta controlada por la temperatura.

El conocimiento de la bioquímica fisiológica es necesario para tratar de proporcionar diagnósticos oportunos, por ello es necesario evaluar los niveles de algunos de los componentes de la hemolinfa para determinar si pueden ser utilizados como posibles indicadores del estado fisiológico, el cual a su vez pudiera ser utilizado para determinar la susceptibilidad de los organismos ante las condiciones de cultivo, alguna enfermedad o su estado nutricional (Vargas-Albores *et al.*, 1991; Bachere *et al.*, 1995).

Las variaciones de la presión osmótica, y la concentración en la hemolinfa de la glucosa, los triglicéridos, las proteínas, del lactato y el colesterol han sido utilizados con el fin de establecer el estado fisiológico de

camarones en cultivo y en relación con la talla, el estadio de muda y las condiciones de cultivo (Lignot *et al.*, 1999), del oxígeno disuelto (Charmantier *et al.*, 1994), de la calidad de los reproductores (Palacios *et al.*, 1998, Racotta y Palacios, 1998, Palacios *et al.*, 1999) y de la alimentación (Rosas *et al.*, 1995a), entre otros. En estos estudios se ha puesto en evidencia que la integración de diversos componentes de la hemolinfa y los metabolitos resultantes de la actividad fisiológica pueden ser utilizados como indicadores del estado fisiológico de los organismos. Si estos indicadores son evaluados paralelamente a la actividad de la proFO y a los niveles de los hemocitos, se puede tener una visión integral de los mecanismos fisiológicos que son alterados, incluyendo algunos de los involucrados en los sistemas de defensa (I.e Moullac *et al.*, 1997). Esto es particularmente importante si se considera que los machos adultos de diversas especies de camarón del género *Litopenaeus*, son particularmente sensibles a las alteraciones producidas por el cautiverio con la consecuente pérdida de su capacidad reproductiva.

La observación de que los reproductores en los sistemas de cultivo frecuentemente estaban expuestos a mayores temperaturas que en la naturaleza, marcó el preámbulo de algunas investigaciones acerca del efecto de la temperatura sobre la calidad reproductiva. Desde 1985 Bray *et al.* (1985), reportaron que en los machos de *L. setiferus* mantenidos a 27 °C por 30 días el síndrome de degeneración y el de melanización son detenidos. En los machos adultos de ésta misma especie Pascual *et al.* (1998) investigaron el efecto de la temperatura sobre la degeneración (26 °C y 30 °C) y la regeneración del espermatóforo (25 °C, 30 °C y 33 °C). Los resultados revelaron que después 30 días, los camarones mantenidos en la menor temperatura (27 °C) no presentan degeneración, a diferencia de aquellos que estuvieron en 31 °C y 33 °C, en los cuales estuvo presente tanto el síndrome de degeneración como el de melanización, siendo de mayor magnitud en la mayor temperatura. En base a estos resultados se diseñó la presente investigación en la cual utilizamos la temperatura de 33 °C como mecanismo activador de las alteraciones frecuentemente observadas en los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por mayor tiempo (dos a tres semanas) a temperaturas menores de 30 °C, y así poder evaluar variables metabólicas e inmunes en relación al deterioro de la calidad reproductiva.

Como ya se mencionó, *L. setiferus* es una especie con amplio potencial para el cultivo. Es una alternativa viable para el desarrollo de la camaronicultura en el Golfo de México. No obstante, es necesario ahondar en los aspectos relacionados con la producción masiva de nauplios, lo cual parece ser una limitante productiva importante. Por esta razón es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la pérdida de la calidad reproductiva de los machos a través de la evaluación de los

diversos aspectos fisiológicos e inmunológicos involucrados. En este sentido el presente estudio ha sido diseñado con la siguiente hipótesis y objetivos.

Hipótesis

Como organismos poiquiloterms, el metabolismo general de los camarones está gobernado por la temperatura. Una temperatura muy alta (33 °C) puede fungir como factor activador de mecanismos de compensación asociados al cautiverio en menor tiempo. La demanda de energía y/o las alteraciones fisiológicas generadas por los mecanismos compensatorios se puede manifestar en cambios a nivel de los sustratos energéticos, del sistema inmune y de la calidad reproductiva.

Objetivo General

Conocer las alteraciones sobre la respuesta fisiológica, la respuesta inmune y la calidad reproductiva que experimentan los machos adultos de *Luopenaeus (Penaeus) setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C, utilizando como marco de referencia los datos obtenidos de una población de machos recién capturados.

Objetivos Particulares

1. Establecer los niveles de colesterol, glucosa, proteínas, calcio, lactato, triacilglicéridos en la hemolinfa y capacidad osmótica, así como la actividad de fenoloxidasa, el estado del proceso de melanización, y las variaciones en el conteo y la caracterización de los hemocitos en una población de machos de *L. setiferus* recién capturados.
2. Conocer el efecto del tiempo de cautiverio (10 días) sobre los niveles de colesterol, glucosa, proteínas, calcio, lactato, triacilglicéridos en la hemolinfa y capacidad osmótica, y su relación con la calidad reproductiva de los machos adultos de *L. setiferus* expuestos a 33 °C.
3. Conocer el efecto del tiempo de cautiverio (10 días) sobre la actividad de fenoloxidasa, el seguimiento del proceso de melanización y las variaciones de los hemocitos totales (HT), células granulares (CG), células semigranulares (CSG) y células hialinas (CH), y su relación con la respuesta fisiológica y la calidad espermática de los machos adultos de *L. setiferus* expuestos a 33 °C.

Material y métodos

Origen de los organismos

Los camarones fueron capturados durante los meses de septiembre a noviembre de 1998, en la zona costera adyacente a la Laguna de Términos, situada en el litoral del suroeste del Golfo de México a 91°51' de longitud W y 18°27' de latitud N en el Estado de Campeche (Ponce y Botello, 1991). Debido a las características de la zona, las capturas se realizaron a una profundidad máxima de 5 brazas con una red de filamento con apertura de malla de 2.5 pulgadas. Con el fin de abatir el estrés generado por la captura y el transporte, los organismos fueron conducidos al laboratorio en bolsas de polietileno con agua del medio en ambiente saturado de oxígeno y a baja temperatura (25 °C).

I. Línea Base

La "Línea Base" fue definida a partir de un total de 90 camarones procedentes de 3 capturas, los cuales no fueron alimentados con el propósito de eliminar la alteración del metabolismo asociada al proceso de digestión y asimilación del alimento (Acción Dinámica Específica) (Prosser, 1950).

Una vez en el laboratorio se utilizaron como criterios de selección el tamaño y la apariencia morfológica saludable de los camarones para elegir a 30 machos adultos de cada captura, los cuales fueron transferidos a 2 tanques circulares de color negro (1.58 m de diámetro por 0.38 m de altura) con capacidad de 500 L. Los tanques contaban con aireación constante y sistema de flujo cerrado con agua de mar pasada por filtros de arena y de cartucho de 20 μ . La calidad del agua se mantuvo por medio de un filtro biológico adaptado a cada tanque. El área experimental fue ajustada con un gradiente de iluminación con fotoperiodo de 14 h de luz por 10 h de oscuridad. Se registraron los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, amonio y nitritos) cada 12 horas durante el transcurso de la prueba (42 h).

Las evaluaciones utilizadas para caracterizar a una población de machos de *L. setiferus* recientemente capturados se ven resumidas en la Tabla A.

Tabla A. Diseño experimental de los machos adultos de *L. setiferus* recién capturados.

| <i>Diseño</i> | <i>Respuestas</i> | <i>Evaluaciones</i> |
|--|-------------------------|---|
| Completamente aleatorizado | Inmunológica | Actividad de fenoloxidasa |
| | | Conteo de |
| | | Hemocitos totales |
| | | Células granulares |
| | | Células semigranulares |
| | | Células hialinas |
| Fechas de captura | | Seguimiento del proceso de melanización |
| - 8 de Octubre | | del aparato reproductor |
| - 19 de Octubre | | Estado de muda |
| - 8 de Noviembre | | Presión osmótica |
| Duración de cada bioensayo | Bioquímico- fisiológica | Niveles en la hemolinfa de |
| 42 h | | Colesterol |
| | | Proteínas |
| | | Glucosa |
| | | Triacilglicéridos |
| | | Lactato |
| Horario de muestreo durante los seguimientos de 24 h | Reproductiva | Peso del espermátforo |
| - 9:00 | | Producción y caracterización de espermatozoides |
| - 13:00 | | Concentración de glucógeno en los componentes de espermátforo |
| - 17:00 | | |
| - 21:00 | | |
| - 1:00 | | |
| - 5:00 | | |

Con el propósito de otorgar a los camarones un tiempo mínimo de recuperación para abatir el estrés producido por la captura, los organismos permanecieron sin manipulación por un lapso de 18 h. Una vez transcurrido este tiempo y con el propósito de observar la dinámica de los componentes de la hemolinfa en un ciclo de 24 h, fueron elegidos al azar cinco machos cada cuatro horas (0900, 1300, 1700, 2100, 0100 y 0500 h) y colocados en un baño frío (20 °C) para disminuir su metabolismo durante el traslado del tanque al laboratorio, en donde se realizaron las evaluaciones de los parámetros bioquímicos, inmunológicos y de calidad reproductiva. La permanencia en el baño frío no fue mayor a 30 minutos.

Evaluaciones inmunológicas, bioquímico fisiológicas y reproductivas

Obtención de hemolinfa

La hemolinfa se extrajo por punción en el seno ventro lateral del abdomen, con una jeringa hipodérmica de 3 mL con aguja de 21G x 32 mm. La jeringa fue incubada previamente con solución fría (8 °C) de citrato de sodio (12.5%) (Martin *et al.*, 1991). Inmediatamente después de ser extraída, la hemolinfa se puso sobre parafilm colocado sobre un recipiente con hielo para mantener fría la muestra.

1. Evaluaciones inmunológica

El material de plástico y cristalería empleado durante las mediciones fue lavado con ETOXA-CLEAN (Sigma) para evitar la activación espontánea del sistema profenoloxidasa por endotoxinas. Por esto misma razón las soluciones se prepararon usando agua libre de pirógenos y filtradas en un "Acrodisco" de 0.2 µm.

Obtención del contenido granular de hemocitos

Durante éste paso por cada volumen de hemolinfa se utilizaron dos volúmenes de solución isotónica fría para camarón (8 °C) (SIC-EDTA): 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA.Na₂, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/Kg (Vargas-Albores *et al.*, 1993). La muestra se centrifugó a 2500 rpm por 3 min. Se separó el plasma y el paquete celular fue resuspendido en amortiguador de cacodilatos previamente enfriado (8 °C) (100 mM cacodilatos, 10 mM CaCl₂, pH 7.0) y se centrifugó a 10000 rpm por 2 min. El sobrenadante, denominado sobrenadante del contenido granular (CG), se utilizó como fuente de actividad de fenoloxidasa (Hernández-López *et al.*, 1996).

Determinación de la actividad de fenoloxidasa total (proFO+FO) y fenoloxidasa (FO)

La actividad de fenoloxidasa (FO) fue determinada midiendo espectroscópicamente la oxidación de la L-hydroxi fenil alanina (L-DOPA), de acuerdo a Leonard *et al.* (1985). Sin embargo, se hizo una modificación reportada por Hernández-López *et al.* (1996) que consiste en la utilización de microplacas para la determinación en muestras de pequeño volumen. Para la evaluación de fenoloxidasa total es necesario asegurar la conversión de la profenoloxidase (proFO) a su forma activa, fenoloxidasa (FO), para lo cual, se incubaron 50 µL de contenido granular de hemocitos con 50 µL de tripsina tipo IX de páncreas de bovino (0.1 mg/mL) durante 3 min a 25 ± 2 °C. Posteriormente, 50 µL de L-DOPA (3 mg/mL en amortiguador de cacodilatos) fueron suministrados a la reacción y se incubó durante 10 min

(Hernández-López *et al.*, 1996). Se registró la absorbancia de la reacción a 490 nm en un lector de microplacas (BIO-RAD Modelo 550). Para determinar la actividad de fenoloxidasa en plasma (FO) fue omitida la incubación primaria con tripsina y se prosiguió de igual manera a la descrita anteriormente.

Conteo de hemocitos

Se mezclaron 150 μL de hemolinfa con un volumen igual de solución Alsever (113 mM glucosa, 27.2 mM citrato de sodio, 2.8 mM ácido cítrico, 71.9 mM NaCl) y formol al 10% (v/v) (Le Moullac *et al.*, 1997). La muestra se guardó en refrigeración hasta su análisis, para lo cual se utilizó un microscopio óptico (Micromaster, Fisher Scientific). Con el propósito de comparar los métodos para el conteo total de hemocitos, se emplearon dos tipos de hematocitómetros: cámara de Malassez con volumen de 0.01 mm^3 y de Neubauer con volumen de 0.1 mm^3 . El conteo total de hemocitos se realizó manual y automáticamente mediante un analizador de imágenes acoplado al microscopio. Los detalles del análisis comparativo entre los métodos se presenta en el Anexo 3. Los hemocitos totales (HT) reportados en el texto fueron obtenidos a partir del analizador de imágenes. La caracterización de los hemocitos se realizó en la cámara de Malassez de acuerdo a Le Moullac *et al.* (1997), en base al tamaño, la forma y el contenido granular y se clasificaron como células granulares (CG), semigranulares (CSG) y hialinas (CH).

Seguimiento del proceso de melanización.

El estado de melanización del sistema reproductor se clasificó de acuerdo a Chamberlain *et al.* (1983), en base a la coloración externa del aparato reproductor: 1) Camarones sanos con ámpulas blancas. 2) Inicio de la infección observándose color café claro en algunos puntos del ámpula. 3) Infección avanzada en el ámpula terminal donde se ha desarrollado un color café y oscurecimiento gradual de los bordes hacia el centro a tejido totalmente oscuro y 4) Infección extrema caracterizada por la melanización del tracto reproductor completo incluyendo los testis.

2. Evaluaciones bioquímico fisiológicas

Las concentraciones de los metabolitos en la hemolinfa se determinaron a partir de volúmenes pequeños de muestra y utilizando el lector de microplacas (BIO-RAD Modelo 550) de acuerdo a Hernández-López y Vargas-Albores (1996).

Estadio de muda

Se determinó el estadio de muda de los camarones mediante el estado de setogénesis observada en los urópodos (Chan *et al.*, 1988), y se clasificó como: postmuda (B), intermuda (C) y premuda (D).

Determinación de la presión osmótica.

La presión osmótica se obtuvo a partir de 20 μL de hemolinfa, la cual fue analizada en un micro-
osmómetro (Osmete, 20 plus) La capacidad osmótica (CO-Hipo) fue calculada a partir de la diferencia
entre la presión osmótica de la hemolinfa y la del agua del medio, de acuerdo a Lignot *et al.* (1999).

Determinación de glucosa

Se colocaron 10 μL de plasma en una microplaca y se adicionaron 200 μL de solución reactiva provista
por el kit comercial Merck GOD-PAD, Cat. 740393 (PBS 0.1 M L^{-1} , pH 7.5; 4-aminofenazona 0.25
 mM L^{-1} ; fenol 0.75 mM L^{-1} ; glucosa oxidasa $>7.5 \text{ kU L}^{-1}$ y peroxidasa $>1.5 \text{ kU L}^{-1}$). Posteriormente
fueron incubadas a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 30 min y se registró la absorbancia a 490 nm. La concentración
de glucosa (mg/mL) se calculó con una curva patrón utilizando el estándar comercial obtenido con el
kit.

Determinación de proteínas totales

Se utilizó una prueba comercial para microdeterminaciones basada en la técnica de Bradford (1976). Se
colocaron 50 μL de plasma diluido (1:500 con agua destilada) en una microplaca y se añadieron 200
 μL de solución reactiva (Brilliant blue G, 3.5 mg L^{-1} en ácido fosfórico y metanol). Las muestras se
incubaron a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 2 min y se registró la absorbancia a 630 nm. La concentración de
proteína (mg/mL) se calculó con una curva patrón utilizando el estándar comercial de albúmina
humana obtenido con el kit (Sigma. Cat. 610-A).

Determinación de lactato

Se colocaron 10 μL de plasma en una microplaca y se adicionaron 200 μL de la solución reactiva del
kit comercial Sigma. Cat. 735 (PBS pH 7.2: lactato oxidasa 400 U L^{-1} ; peroxidasa 2400 U L^{-1}).
Posteriormente fueron incubadas a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ por 30 min y se leyó la absorbancia a 490 nm. La
concentración de lactato (mg/mL) se calculó con una curva patrón utilizando el estándar comercial
(Sigma 735-11).

Determinación de triacilglicéridos

Se colocaron 10 μL de plasma en una microplaca y se adicionaron 200 μL de solución reactiva del kit comercial Merck, GPO-PAP. Cat. 14354 (PIPES pH 7.5, 0.1 M L^{-1} ; acetato de magnesio 12.8 mM L^{-1} ; 4-aminoatiripina 1 mM L^{-1} ; ATP 2 mM ; 2 clorofenol 2 mM L^{-1} ; peroxidasa: $\geq 1 \text{ U L}^{-1}$; glicerorsinasa 0.2 U L^{-1} ; glicerol-3-fosfato-oxidasa 1.5 U mL^{-1} ; lipasa 10 U L^{-1} y polietilenglicolmonoeteleter 2 g L^{-1}). Se incubó la reacción a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min y se leyó la absorbancia a 490 nm. La concentración de triacilglicéridos (mg/mL) se calculó con una curva patrón utilizando el estándar comercial obtenido con el kit.

Determinación de colesterol

Se colocaron 20 μL de plasma en una microplaca y se adicionaron 200 μL de solución reactiva del kit comercial Merck, CHOD-PAD. Cat. 14349 (PBS pH 7.5, 0.2 M L^{-1} ; fenol 3 mM L^{-1} ; polietilenglicoléter 4 g L^{-1} ; polietilglicolmonoalquiléter 1 g L^{-1} ; 1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-antipirina 0.08 M L^{-1} ; colesterol esterasa $> 4 \text{ kU L}^{-1}$; colesterol oxidasa $> 4 \text{ U L}^{-1}$ y peroxidasa $> 80 \text{ kU L}^{-1}$). Las muestras se incubaron a $25 + 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min y se registro la absorbancia a 490 nm. La concentración de colesterol (mg/mL) se calculó utilizando la constante de conversión del kit.

Determinación de calcio

Se colocaron 10 μL de plasma en una microplaca y se adicionaron 200 μL de solución reactiva del kit comercial Sigma Cat. 587-A (2-Amino-2-Metil-1, 3Propanediol 500 mol L^{-1} ; 0-Cresolftaleina Complexona 0.024%; 8-Hydroxiquinolina 0.25%). Se incubó la reacción a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min y se leyó la absorbancia a 630 nm. La concentración de calcio (mg/mL) se calculó con una curva patrón utilizando el estándar comercial (Sigma Cat. 360-5).

3. Evaluaciones reproductivas

Peso húmedo de los organismos

Una vez obtenida la hemolinfa, los organismos fueron pesados en una balanza granataria (OHAUS, TS400).

Determinación de la calidad espermática

Se extrajeron ambas mitades del espermátforo y se pesaron en una balanza analítica (OHAUS, AS120). El medio espermátforo derecho se utilizó para determinar la calidad espermática, la cual se evaluó a partir del conteo de espermatozoides y de su viabilidad. Para ello, el medio espermátforo fue homogenizado a 1000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente (26 °C), en solución libre de calcio: 370 mM NaCl, 15 mM KCl, 8.7 mM H₂BO₃, 4.7 mM NaOH, 40.9 mM MgSO₄·7H₂O (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987). Posteriormente se le agregó 0.1 mL de azul de tripan (tripan blue 0.1% en solución salina al 0.9%) (Betancourt-Bravo, comunicación personal). Después de 10 minutos el conteo y la clasificación de las células espermáticas se realizaron utilizando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Micromaster, Fisher Scientific). Las células anormales fueron reconocidas por la presencia de malformaciones de la cabeza o la ausencia de la cola en base a su refringencia. Las células muertas se identificaron por ser teñidas de color azul.

Determinación del glucógeno en los componentes del espermátforo.

La cantidad de glucógeno se determinó de acuerdo a Dubois *et al.* (1965). Con la mitad izquierda del espermátforo se evaluó la concentración de glucógeno en la masa espermática y la materia sementante. Las partes fueron procesadas por separado: la muestra fue pesada y homogeneizada en 150 µL de ácido tricloroacético (5%), después se centrifugó a 800 g, y se utilizó un volumen de sobrenadante por 5 volúmenes de etanol (95%). A continuación se incubó por 3 h a 37 °C y se centrifugó a 800 g por 15 minutos. Se prosiguió con el precipitado: el glucógeno se disolvió con 20 µL de agua hirviendo y se agregó 1 mL de ácido sulfúrico y 0.2 mL de fenol (5%), se registró la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (BIO-RAD Modelo 550). Si el espermátforo era demasiado pequeño como para separar las partes se procesó como estructura completa.

II. Organismos mantenidos en cautiverio

Una vez en el laboratorio los camarones ($n=60$) fueron colocados por 24 horas en un tanque de 10 m², el cual tenía un sistema de recambio diario del 100% de agua de mar filtrada, salinidad de 32 ± 1 ‰, temperatura de 29.7 ± 0.6 °C, gradiente de iluminación con fotoperiodo de 14 h de luz por 10 h de oscuridad y oxígeno disuelto mayor a 5.5 mg L⁻¹. Una vez completado este tiempo los camarones

fueron distribuidos en tres tanques circulares de 500 L. Estos tanques fueron acoplados a un sistema de flujo semicerrado conectado a un filtro biológico. El día cero fue determinado tomando en cuenta camarones con 24 horas de aclimatación en este sistema experimental. En el día cero se tomaron al azar 10 organismos los cuales fueron utilizados como referencia inicial. Después de este muestreo, la temperatura del agua se incrementó de manera paulatina hasta alcanzar los 33 °C usando calentadores de inmersión especiales para agua de mar (Thermal Pre-set, Hagen de 300 W), la temperatura se mantuvo constante durante los 10 días que duró el experimento.

A lo largo de la prueba los organismos fueron alimentados *al libitum* con calamar (*Loligo sp*) y alimento pelletizado especial para maduración (Microfeast, Maturation 608) en proporción 9:1 respectivamente, repartido en 3 tomas/día (0800, 1400 y 2000 h). A los animales se les suministró el alimento fresco a las 0800 y 2000 h y el alimento artificial a las 1400 h. Transcurridas dos horas, el alimento remanente se retiró y pesó. Los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, amonio y nitritos) se registraron diariamente dos veces al día (0730 y 1600 h).

Durante los 10 días de cautiverio, se escogieron aleatoriamente 6 machos a las 0900 h, los cuales fueron colocados en un baño de agua de mar fría (20 °C), la permanencia en el baño frío no fue mayor a 30 minutos. Esto se hizo con el fin de disminuir su metabolismo durante el transporte de los tanques al laboratorio en donde se les realizaron las evaluaciones de los parámetros bioquímicos, inmunológicos y de calidad reproductiva. En los machos mantenidos en cautiverio se evaluaron las mismas respuestas que en los machos recién capturados, las técnicas empleadas fueron descritas con anterioridad. El diseño experimental utilizado se describe en la Tabla B.

El día cero del experimento de alta temperatura se mantuvo bajo las mismas condiciones de manejo que los bioensayos de línea base, por lo cual, las evaluaciones reproductivas pudieron ser comparadas entre las cuatro capturas (tres capturas de línea base y una captura correspondiente al experimento de alta temperatura).

Tabla B. Diseño experimental de los machos adultos de *L. setiferus* expuestos a 33 °C por 10 días

| | <i>Diseño</i> | <i>Respuestas</i> | <i>Evaluaciones</i> |
|---|---|-------------------------|---|
| Efecto del cautiverio (10 días) a 33 °C | Completamente aleatorizado | Inmunológica | Actividad de fenoloxidasas Cuento de Hemocitos totales Células granulares Células semigranulares Células hialinas |
| | Fecha de captura 19 de Septiembre | | Seguimiento del proceso de melanización del sistema reproductor |
| | Muestreo diario durante 11 días (incluyendo el valor inicial) | Bioquímico- fisiológica | Estado de muda Presión osmótica Niveles en la hemolinfa de Colesterol Proteínas Glucosa Triacilglicéridos Lactato |
| | | Reproductiva | Peso del espermátforo Producción y caracterización de espermatozoides Concentración de glucógeno en los componentes de espermátforo |

Análisis estadístico

Para verificar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de "Kolmogorov-Smirnof". Se utilizaron las transformaciones de arcoseno antes de procesar los datos presentados en porcentaje y logaritmo base 10 para aquellos que presentaron una distribución anormal.

Se aplicó un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) para establecer la posible diferencia entre los días de cautiverio de los organismos expuestos a alta temperatura. El estudio de línea base se efectuó por análisis de varianza de dos vías, considerando como criterios de clasificación la fecha de captura y la hora de muestreo. Se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan para ponderar las diferencias entre los promedios. Se trabajó con 95% de confianza para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$).

Se aplicaron pruebas de correlación entre los diversos componentes de la hemolinfa para detectar su influencia sobre la calidad reproductiva y la respuesta inmune (Zar, 1974). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa STATISTICA versión 4.5.

Resultados

I. Línea base

La sobrevivencia de los machos durante los bioensayos de línea base fue alta (97.8%), revelando que la manipulación por la captura y el traslado no generaron lesiones graves en los organismos. El sistema experimental fue abastecido con agua de mar natural con características similares a las del medio. En la tabla 1 se presentan los parámetros fisicoquímicos del agua de mar utilizada para mantener a los camarones que fueron considerados para los bioensayos de línea base. Las fluctuaciones de los factores fisicoquímicos entre los bioensayos reflejan las condiciones naturales correspondientes a las estaciones climáticas de los meses en los cuales se realizaron las capturas: lluvias (septiembre-octubre) y nortes (octubre-noviembre).

Tabla 1. Factores fisicoquímicos del agua de mar utilizada durante los bioensayos de línea base. Valores promedio + desviación estandar.

| Fecha 1998 | Temperatura °C | Salinidad ‰ | pH | Oxígeno disuelto (mg/L) |
|---------------|-------------------|----------------|------------|----------------------------|
| 19-septiembre | 31.33 + 0.74 | 30.0 + 0.55 | 7.9 + 0.11 | 5.17 + 0.32 |
| 8-octubre | 30.01 + 0.42 | 33.6 + 0.54 | 8.0 + 0.07 | 5.48 + 0.18 |
| 19-octubre | 29.06 + 0.40 | 33.3 + 0.44 | 8.2 + 0.08 | 4.47 + 0.35 |
| 8-noviembre | 26.76 + 0.24 | 30.6 + 0.44 | 8.0 + 0.04 | 5.33 + 0.96 |

a) Estado de muda

El 38.8% de los machos de *L. setiferus* recién capturados se encontraron en posmuda (B), el 60% en intermuda (C) y el 1% en premuda (D). Los resultados de este estudio muestran que tanto los conteos de hemocitos como los valores bioquímicos son significativamente mayores en estadio C ($P < 0.05$) (Tabla 2). Tomando en cuenta que el metabolismo en general es más estable en estadio C, para el análisis de correlaciones y la obtención de los rangos de la línea base se consideraron sólo a los machos que se encontraban en éste estadio.

Tabla 2. Evaluaciones bioquímicas (mg/mL) y citológicas (células/mm³) de los machos de *L. setiferus* recientemente capturados en estadio de intermuda (C) y posmuda (B). Valores promedio \pm error estandar.

| | Estadio de Muda | |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | B | C |
| Número | 33 | 51 |
| HT | 54246 \pm 952 ^a | 77402 \pm 197 ^b |
| CG | 4725 \pm 48 ^a | 5825 \pm 82 ^b |
| CSG | 26050 \pm 253 ^a | 38275 \pm 313 ^b |
| CH | 21250 \pm 299 ^a | 31154 \pm 659 ^b |
| Triacilglicéridos | 0.299 \pm 0.03 ^a | 0.419 \pm 0.03 ^b |
| Glucosa | 0.089 \pm 0.01 ^a | 0.138 \pm 0.01 ^b |
| Colesterol | 0.941 \pm 0.09 ^a | 1.417 \pm 0.10 ^b |
| Lactato | 0.056 \pm 0.01 ^a | 0.081 \pm 0.01 ^b |

Promedios seguidos de diferente letra en un mismo renglón denotan diferencia significativa ($P < 0.05$).

b) Parámetros reproductivos

A pesar de que el peso de los machos de la última captura fue 11% mayor ($P < 0.05$) a las primeras tres (Figura 1), la calidad reproductiva de los machos se mantuvo constante. Entre las capturas no se encontraron diferencias significativas en el peso del espermátforo, la producción total de espermatozoides ni en el porcentaje de espermatozoides normales ($P > 0.05$) (Figura 2). El estudio comparativo entre los machos con presencia y ausencia de espermátforo reveló importantes diferencias (Tabla 3), en los organismos con espermátforo presente el peso fue 17% mayor ($P < 0.05$). Mientras que las concentraciones de glucosa, triacilglicéridos y colesterol fueron 18, 26 y 28% mayores respectivamente, en los machos sin espermátforo ($P < 0.05$).

Tabla 3. Peso del organismo y evaluaciones bioquímicas (mg/mL) de machos adultos de *L. setiferus*. Valores promedio \pm error estandar.

| | Espermátforo | |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Presencia | Ausencia |
| Número | 28 | 23 |
| Peso (g) | 37.71 \pm 0.93 ^a | 30.57 \pm 0.58 ^b |
| Triacilglicéridos | 0.37 \pm 0.03 ^b | 0.50 \pm 0.05 ^a |
| Glucosa | 0.13 \pm 0.01 ^b | 0.16 \pm 0.01 ^a |
| Colesterol | 1.20 \pm 0.10 ^b | 1.68 \pm 0.18 ^a |

Promedios seguidos de diferente letra en un mismo renglón denotan diferencia significativa ($P < 0.05$).

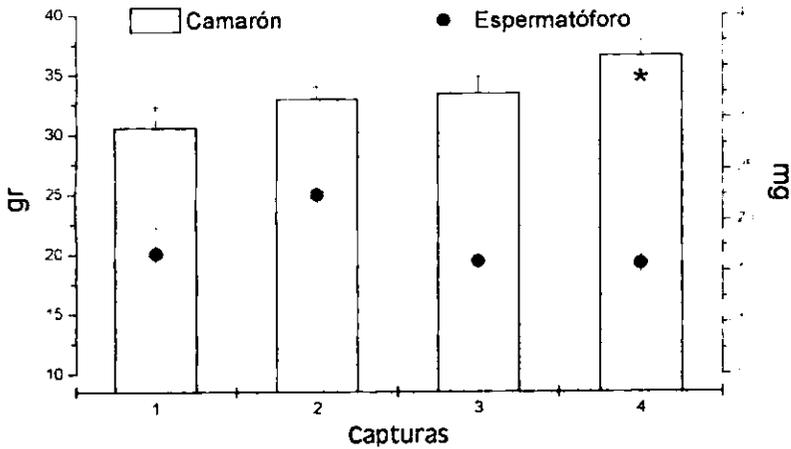


Figura 1 Peso húmedo (g) de los machos de *L. setiferus* recién atrapados y peso del espermatóforo (mg) por captura. Valor promedio \pm E.S.
 * indica diferencia significativa ($P < 0.05$)

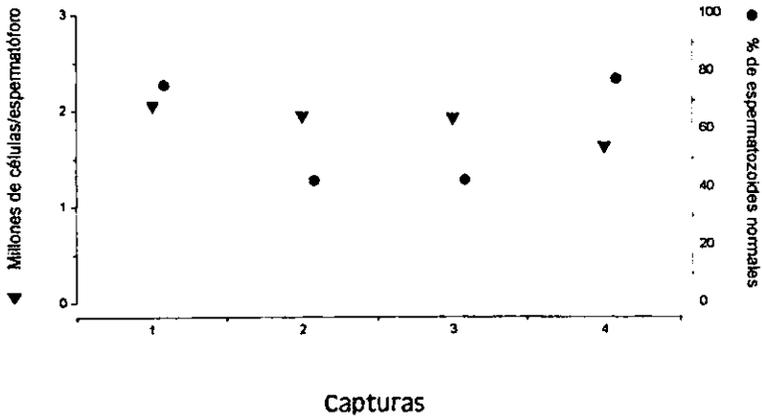


Figura 2. Conteo total de espermatozoides (millones/espermatóforo) y porcentaje de espermatozoides normales por captura, en machos de *L. setiferus* recién atrapados. Valor promedio \pm E.S.

c) Componentes de la hemolinfa

1c. Evaluaciones del sistema inmune

La mayoría de las evaluaciones de la respuesta inmune de los machos recientemente capturados se mantuvieron constantes entre los meses de muestreo. Cuando se compararon el conteo de los hemocitos totales (HT), las células granulares (CG) y hialinas (CH), y la actividad de fenoloxidas total (proFO+FO), de los animales provenientes de diferentes capturas, no se observaron diferencias significativas (Tabla 4). Solamente el número de CSG fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en la última captura.

Tabla 4. Evaluaciones bioquímicas (mg/mL) y citológicas (células/mm³) de machos de *L. setiferus* por captura. Valores promedio \pm error estandar.

| | Capturas | | | |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
| | 2 ^a | 3 ^{era} | 4 ^a | 5 ^a |
| HT | 60700 \pm 5337 ^a | 77399 \pm 7802 ^a | 88834 \pm 6529 ^a | |
| CG | 4769 \pm 406 ^a | 5750 \pm 439 ^a | 6610 \pm 488 ^a | |
| CSG | 25384 \pm 2124 ^b | 35550 \pm 3251 ^b | 49389 \pm 3506 ^a | |
| CH | 29923 \pm 3340 ^a | 31950 \pm 2810 ^a | 31326 \pm 2729 ^a | |
| proFO+FO | 0.458 \pm 0.060 ^a | 0.694 \pm 0.146 ^a | 0.561 \pm 0.130 ^a | |
| Glucosa | 0.171 \pm 0.018 ^a | 0.159 \pm 0.021 ^a | 0.127 \pm 0.11 ^a | |
| Calcio | 0.536 \pm 0.042 ^a | 0.377 \pm 0.034 ^b | 0.257 \pm 0.018 ^c | |
| Colesterol | 0.931 \pm 0.130 ^b | 1.646 \pm 0.164 ^a | 1.631 \pm 0.140 ^a | |
| Proteínas | 1124.9 \pm 106 ^a | 382.8 \pm 53.3 ^b | 264.6 \pm 27.6 ^c | |

Promedios seguidos de diferente letra en un mismo renglón denotan diferencia significativa ($P < 0.05$).

2c. Parámetros bioquímicos

Cuando se compararon las concentraciones de glucosa de los animales provenientes de diferentes capturas, no se encontraron diferencias significativas, a diferencia de los niveles de proteínas, de calcio y de colesterol que fluctuaron de manera significativa (Tabla 4). Los únicos dos parámetros que presentaron diferencias significativas entre las horas de muestreo (ciclo de 24 h) pero no entre las capturas, fueron el lactato y los triacilglicéridos. En estos metabolitos es posible observar un patrón, en donde las concentraciones de las últimas horas de muestreo fueron 40% mayores para los triacilglicéridos y 50% para el lactato (Figura 3).

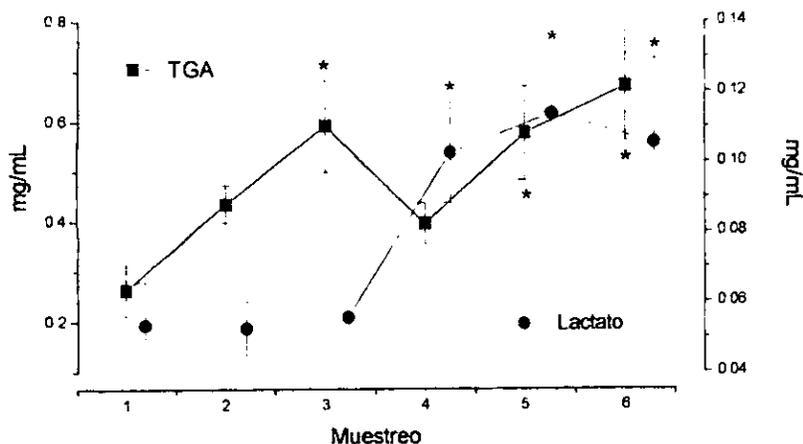


Figura 3. Concentraciones de triacilglicéridos (TGA) y de lactato (mg/mL) en la hemolinfa en machos de *L. setiferus* recién capturados, durante un ciclo de 24 horas * indica diferencia significativa ($P < 0.05$).

d) Análisis de correlaciones

1d. Aspecto reproductivo

El peso de los machos de *L. setiferus* presentó una correlación positiva con el peso del espermátforo (r de 0.51) y con el porcentaje de espermatozoides normales (r de 0.56). En contraste, la asociación entre el peso de los camarones y el porcentaje de células espermáticas anormales fue negativa (r de -0.56). A su vez, el peso del espermátforo presentó correlación positiva con el total de espermatozoides (r de 0.58), el porcentaje de normales (r de 0.53) y una correlación negativa con el porcentaje de espermatozoides anormales (Tabla 5). El total de espermatozoides por medio espermátforo presentó correlación positiva con las células germinales normales y correlación negativa con las células germinales anormales en ambos casos con r de 0.38.

La capacidad osmótica hipo (CO-HIPO) reveló correlaciones significativas con el porcentaje de espermatozoides normales, anormales y muertos con una r que osciló de 0.44 a 0.47, en el caso de los espermatozoides anormales y los muertos las correlaciones fueron negativas (Tabla 5).

El porcentaje de espermatozoides normales presentó correlación positiva con los triacilglicéridos y con el colesterol (r de 0.51 a 0.46). En contraste, el porcentaje de espermatozoides anormales presentó correlación negativa con estos mismos metabolitos. El peso del espermátforo derecho reveló correlación positiva con lactato (r de 0.46).

2d. Aspecto fisiológico

Con la capacidad osmótica hipo se encontraron diversas correlaciones positivas. Por un lado la CO-HIPO se asoció con dos de los grupos celulares: CG y CSG (r de 0.28 y 0.36), y con tres de los metabolitos: proteínas, glucosa y colesterol (r de 0.45, 0.28 y 0.24 respectivamente). También la CO-HIPO presentó correlación positiva con el ion calcio donde la r resultante fue de 0.40.

En la tabla 5 podemos observar que algunos de los metabolitos evaluados presentaron asociaciones entre sí; triacilglicéridos con colesterol y con lactato (r de 0.71 y 0.37). Las proteínas mostraron correlación con glucosa (r de 0.38), y el ion calcio con glucosa y con proteínas (r de 0.49 y 0.38). A su vez glucosa presentó una correlación positiva con las CH (r de 0.26).

3d. Aspecto inmunológico

El total de hemocitos (TH) tuvo asociaciones con todos los subtipos celulares (CG, CSG y CH) con una r que osciló entre 0.83 y 0.73. A su vez, las células granulares (CG) se encontraron correlacionadas a los otros dos grupos de células, semigranulares (CSG) (r de 0.82) y hialinas (CH) (r de 0.62). Por último las CSG mostraron asociación con las CH (r de 0.64) y con el valor obtenido de la división entre actividad de fenoloxidasa total y HT (proFO+FO) con r de 0.32 (Tabla 5).

Tabla 5. Correlaciones significativas entre los parámetros evaluados en los machos de *I. setiferus* recién capturados.

| LÍNEA BASE | g.L | r | r ² | P |
|---|-----|-------|----------------|--------|
| Peso (g) vs | | | | |
| <i>Espermatóforo derecho (mg)</i> | 32 | 0.51 | 0.26 | 0.002 |
| % <i>Espermatozoides (E.) normales (arseno)</i> | 27 | 0.56 | 0.31 | 0.001 |
| % <i>E. Anormales (arseno)</i> | 27 | -0.56 | 0.31 | 0.001 |
| Espermatóforo derecho (mg) vs | | | | |
| <i>E. totales ml. (log)</i> | 26 | 0.58 | 0.34 | 0.001 |
| % <i>E. Normales (arseno)</i> | 26 | 0.53 | 0.28 | 0.004 |
| % <i>E. Anormales (arseno)</i> | 26 | -0.53 | 0.28 | 0.004 |
| <i>Lactato (mg mL)</i> | 32 | 0.46 | 0.21 | 0.006 |
| % E. Normales (arseno) vs | | | | |
| <i>E. totales ml. (log)</i> | 27 | 0.38 | 0.14 | 0.042 |
| <i>Triacilglicéridos (mg mL)</i> | 27 | 0.51 | 0.25 | 0.004 |
| <i>Colesterol (mg mL)</i> | 27 | 0.46 | 0.22 | 0.01 |
| % E. Anormales (arseno) vs | | | | |
| <i>E. totales/ml. (log)</i> | 27 | -0.39 | 0.15 | 0.038 |
| <i>Triacilglicéridos (mg mL)</i> | 27 | -0.5 | 0.25 | 0.005 |
| <i>Colesterol (mg/mL)</i> | 27 | -0.46 | 0.21 | 0.011 |
| CO-HIPO vs | | | | |
| % <i>E. Normales (arseno)</i> | 27 | 0.47 | 0.22 | 0.008 |
| % <i>E. Anormales (arseno)</i> | 27 | -0.47 | 0.22 | 0.009 |
| % <i>E. Muertos (arseno)</i> | 27 | -0.44 | 0.19 | 0.02 |
| <i>CG (células mm³)</i> | 49 | 0.28 | 0.08 | 0.03 |
| <i>CSG (células mm³)</i> | 49 | 0.36 | 0.13 | 0.006 |
| <i>Proteínas (mg mL) (log)</i> | 57 | -0.45 | 0.2 | 0.001 |
| <i>Glucosa (mg mL)</i> | 58 | 0.28 | 0.08 | 0.02 |
| <i>Colesterol (mg mL)</i> | 58 | 0.24 | 0.06 | 0.04 |
| <i>Calcio (mg mL)</i> | 55 | 0.4 | 0.16 | 0.002 |
| Triacilglicéridos vs | | | | |
| <i>Colesterol (mg/mL)</i> | 58 | 0.71 | 0.5 | 0.0001 |
| <i>Lactato (mg mL)</i> | 55 | 0.37 | 0.13 | 0.005 |
| Glucosa vs | | | | |
| <i>Calcio (mg mL)</i> | 55 | 0.49 | 0.25 | 0.0001 |
| <i>CH (células mm³)</i> | 49 | 0.26 | 0.07 | 0.049 |
| Proteínas (log) vs | | | | |
| <i>Glucosa (mg mL)</i> | 48 | 0.38 | 0.15 | 0.006 |
| <i>Calcio (mg mL)</i> | 54 | 0.38 | 0.15 | 0.002 |
| Hemocitos totales vs | | | | |
| <i>CG (células mm³)</i> | 49 | 0.74 | 0.55 | 0.0001 |
| <i>CSG (células mm³)</i> | 49 | 0.83 | 0.70 | 0.0001 |
| <i>CH (células mm³)</i> | 49 | 0.73 | 0.53 | 0.0001 |
| CLG vs | | | | |
| <i>CSG (células mm³)</i> | 49 | 0.82 | 0.67 | 0.0001 |
| <i>CH (células mm³)</i> | 44 | 0.62 | 0.39 | 0.0001 |
| CSG vs | | | | |
| <i>prof(O) · FO HT</i> | 40 | -0.32 | 0.1 | 0.03 |
| <i>CH (células mm³)</i> | 49 | 0.64 | 0.41 | 0.001 |

II. Organismos mantenidos en cautiverio

La sobrevivencia de los organismos mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C fue muy alta (98.5%). Durante el periodo experimental los parámetros fisicoquímicos evaluados en el agua se mantuvieron constantes y dentro de los rangos recomendados para el mantenimiento de reproductores peneidos: salinidad entre 28 y 36 ‰, pH de 7.8 a 8.2, y oxígeno disuelto mayor a 5 (Muncy, 1984). La salinidad observada (30 ‰) refleja las condiciones naturales correspondientes a la época de lluvias. Por su parte la temperatura no presentó fluctuaciones significativas ($P > 0.05$) entre los días del bioensayo (Tabla 6).

Tabla 6. Factores fisicoquímicos del agua de mar utilizada durante el experimento de cautiverio. Valores promedio \pm desviación estandar.

| Parámetros | |
|-----------------------|------------------|
| Temperatura Alta (°C) | 32.96 \pm 0.67 |
| Temperatura día 0 | 31.33 \pm 0.12 |
| Salinidad (‰) | 30.05 \pm 0.55 |
| O ₂ (mg L) | 5.18 \pm 0.32 |
| pH | 7.92 \pm 0.11 |
| Amonio (mg/L) | 0.18 \pm 0.14 |
| Nitrato (mg L) | 0.08 \pm 0.08 |

a) Estado de muda

El 10.1% de los machos de *L. setiferus* del experimento de alta temperatura se encontraron en posmuda (B), el 86.9% en intermuda (C), y sólo el 2.8% en premuda (D). Las evaluaciones reproductivas (peso del espermátforo y porcentaje de espermatozoides normales) e inmunológicas (actividad de fenoloxidasa, HT, CG, CSG y CH) no presentaron diferencia entre los estadios de muda C y B (Tabla 7). En cuanto a los indicadores metabólicos, solamente la glucosa y el calcio mostraron diferencias entre estos dos estadios. Considerando que sólo el 28% de los organismos presentaron espermátforos maduros se realizó el análisis sobre el efecto de tiempo de cautiverio a 33 °C incluyendo ambos estadios de muda.

Tabla 7. Evaluaciones bioquímicas (mg/mL), citológicas (células/mm³) y reproductivas de los machos de *L. setiferus* en estado de intermuda (C) y posmuda (B), mantenidos en cautiverio durante diez días a 33 °C. Valores promedio \pm error estandar.

| | Estados de muda | | | |
|--------------------------------------|-------------------|----------------|-------------------|-----------------|
| | B | n | C | n |
| <i>CC-HIPO</i> | -15.5 \pm 15.9 | ^a 6 | -30.2 \pm 5.3 | ^a 52 |
| <i>HT</i> | 48298 \pm 16132 | ^a 4 | 49113 \pm 3521 | ^a 41 |
| <i>CG</i> | 4667 \pm 667 | ^a 3 | 3719 \pm 198 | ^a 39 |
| <i>CSG</i> | 20733 \pm 4532 | ^a 3 | 20824 \pm 1553 | ^a 39 |
| <i>CH</i> | 25067 \pm 5067 | ^a 3 | 23184 \pm 1728 | ^a 39 |
| <i>proFO + FO HT x10⁴</i> | 0.109 \pm 0.034 | ^a 4 | 0.112 \pm 0.012 | ^a 39 |
| <i>proFO + FO (D.O. 490 nm)</i> | 0.467 \pm 0.104 | ^a 6 | 0.527 \pm 0.047 | ^a 38 |
| <i>Triacilglicéridos</i> | 0.253 \pm 0.062 | ^a 6 | 0.366 \pm 0.026 | ^a 50 |
| <i>Glucosa</i> | 0.094 \pm 0.021 | ^a 6 | 0.166 \pm 0.010 | ^b 52 |
| <i>Colesterol</i> | 0.903 \pm 0.185 | ^a 6 | 1.464 \pm 0.138 | ^a 52 |
| <i>Lactato</i> | 0.039 \pm 0.007 | ^a 6 | 0.081 \pm 0.011 | ^a 52 |
| <i>Calcio</i> | 0.349 \pm 0.066 | ^a 6 | 0.657 \pm 0.047 | ^b 51 |
| <i>Proteínas</i> | 165.2 \pm 36.12 | ^a 6 | 207.2 \pm 12.61 | ^a 48 |
| <i>Peso espermátforo (mg)</i> | 16.8 \pm 3.22 | ^a 4 | 18.5 \pm 1.35 | ^a 52 |
| <i>% Espermatozoides</i> | 23.1 \pm 13.38 | ^a 4 | 23.0 \pm 6.03 | ^a 32 |

Promedios seguidos de diferente letra en un mismo renglón denotan diferencia significativa ($P < 0.05$).

b) Parámetros reproductivos

En los organismos mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C el peso de los machos cambió de acuerdo al tiempo, pues el día nueve fue significativamente menor al día cero ($P < 0.05$). Así mismo, se observó un aumento en el consumo del alimento con respecto a los días transcurridos en el experimento, el cual mostró sus máximos valores al séptimo y octavo día (Tabla 8). A pesar del incremento de alimento consumido, los organismos mostraron una tendencia a la pérdida de peso.

Tabla 8. Peso de los camarones y porcentaje del alimento consumido con respecto a la biomasa de los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio durante diez días a 33 °C. Valores promedio \pm error estándar.

| Día | Peso (g) | % Alimento consumido |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 30.62 \pm 1.81 ^a | |
| 1 | 26.65 \pm 2.45 ^a | 11.09 \pm 0.43 ^a |
| 2 | 27.93 \pm 2.16 ^a | 12.56 \pm 0.57 ^a |
| 3 | 29.94 \pm 1.65 ^a | 12.09 \pm 0.51 ^a |
| 4 | 31.93 \pm 0.90 ^a | 12.84 \pm 0.27 ^a |
| 5 | 27.68 \pm 0.62 ^a | 12.99 \pm 0.75 ^a |
| 6 | 26.03 \pm 1.42 ^a | 12.30 \pm 0.25 ^a |
| 7 | 29.06 \pm 2.59 ^a | 15.66 \pm 0.40 ^b |
| 8 | 26.71 \pm 1.25 ^a | 15.13 \pm 1.17 ^b |
| 9 | 23.81 \pm 1.91 ^b | 13.18 \pm 1.32 ^a |
| 10 | 24.85 \pm 1.67 ^a | 12.90 \pm 0.27 ^a |

Promedios seguidos por letras diferentes en una misma columna denotan diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los días del experimento.

La calidad reproductiva de los machos de *L. setiferus* se redujo a lo largo del bioensayo. Aunque el peso del espermátforo y la producción total de espermatozoides por espermátforo no presentaron diferencias significativas (Tabla 9). El porcentaje de espermatozoides normales disminuyó significativamente de 75% al inicio al 10% para el día cuatro y 0% al final del experimento (Figura 4). Mientras tanto, los espermatozoides muertos se presentaron el cuarto día y fueron aumentando de manera significativa hasta alcanzar niveles del 67% para el día nueve.

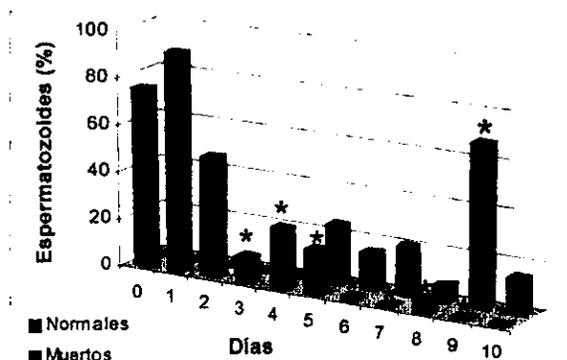


Figura 4. Porcentaje de espermatozoides normales y muertos de los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C. Columna señalada con * indica diferencia significativa con el valor inicial.

Tabla 9. Valores promedio + error estandar del peso de espermatóforo y total de espermatozoides de machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C.

| Día | Espermatóforo (mg) | Células / espermatóforo (x10 ⁶) |
|-----|--------------------------|--|
| 0 | 33.56 ± 2.6 ^a | 4.12 ± 0.49 ^a |
| 1 | 42 ± 0.0 ^a | 0.65 ± 0.00 ^a |
| 2 | 49.8 ± 3.2 ^a | 6.95 ± 2.95 ^a |
| 3 | 41.3 ± 4.2 ^a | 0.41 ± 0.17 ^a |
| 4 | 37.56 ± 2.7 ^a | 1.296 ± 0.32 ^a |
| 5 | 27.84 ± 1.8 ^a | 0.496 ± 0.08 ^a |
| 6 | 22.16 ± 3.2 ^a | 0.416 ± 0.12 ^a |
| 7 | 51.26 ± 3.6 ^a | 0.108 ± 0.03 ^a |
| 8 | 30.46 ± 8.3 ^a | 2.416 ± 0.64 ^a |
| 9 | 37.5 ± 7.4 ^a | 0.266 ± 0.02 ^a |
| 10 | 46.6 ± 7.3 ^a | 1.876 ± 0.14 ^a |

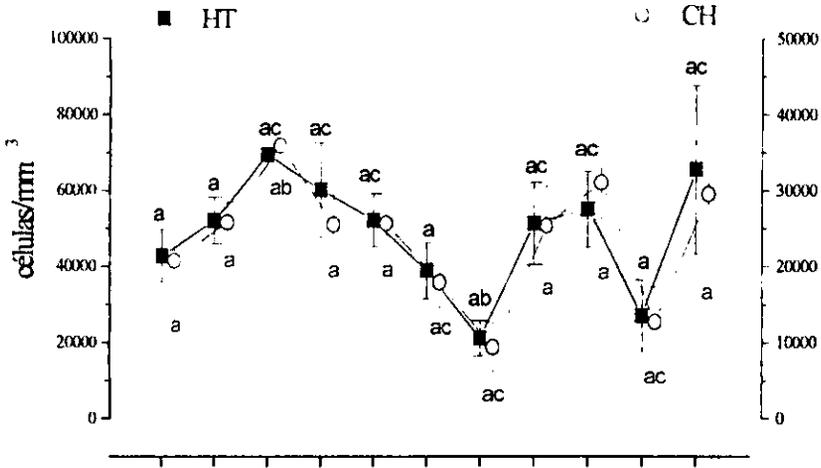
Promedios seguidos de letras diferentes en una misma columna denotan diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los días del experimento.

c) Componentes de la hemolinfa

1c. Evaluaciones del sistema inmune.

El conteo y la caracterización de los hemocitos a lo largo del experimento (10 días) revelan que los HT así como el número de CH y CSG no presentaron diferencias significativas con el valor inicial pero fluctuaron marcadamente durante la prueba, presentando diferencias significativas entre los días. La Figura 5 muestra las disminuciones significativas en los días seis y nueve. El número de CG fue más estable, sin diferencia significativa con el valor inicial, ni entre el resto de los días (Anexo 8).

A



B

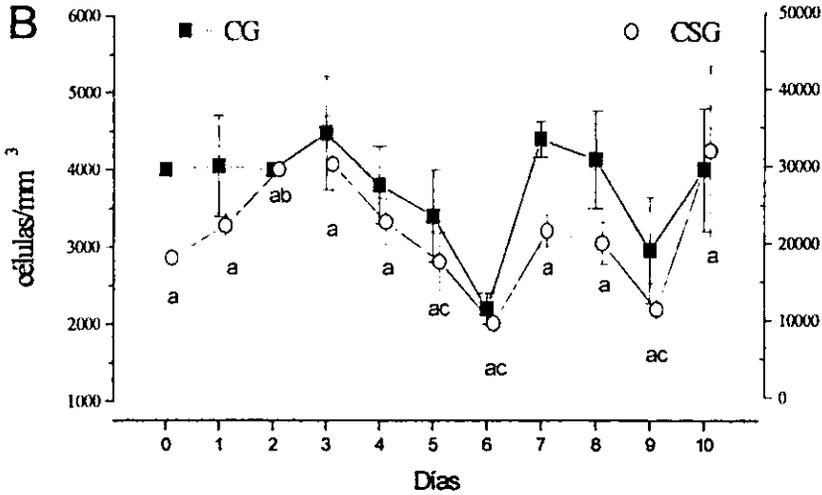


Figura 5. Variaciones diarias de los hemocitos totales y células hialinas (A), y las células granulares (CG) y semigranulares (CSG) (B), de machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C. Valores promedio (células/mm³) ± E.S. Distintas letras indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los días.

La actividad de la fenoloxidasa total (proFO+FO) no presentó diferencias significativas a través del tiempo experimental, sin embargo, reveló patrones de actividad a lo largo de los días, tanto en el contenido granular de hemocitos así como la actividad de fenoloxidasa en plasma (Figura 6). La expresión de la actividad de fenoloxidasa total entre los HT presentó un aumento significativo en el día seis (Figura 6).

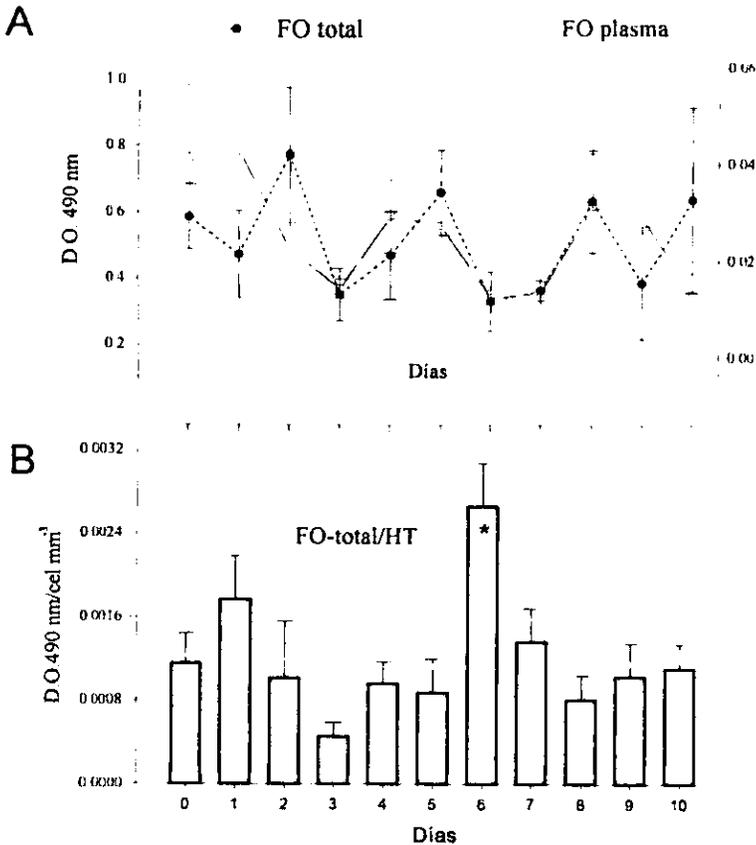


Figura 6. Comportamiento diario de la actividad de fenoloxidasa total (proFO+FO) en el contenido granulas de hemocitos, fenoloxidasa (FO) en el plasma (A), y la actividad de proFO-total/hemocitos totales (B), en machos adultos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C. Valores promedio \pm E.S. * indica diferencia significativa con el valor inicial ($P < 0.05$).

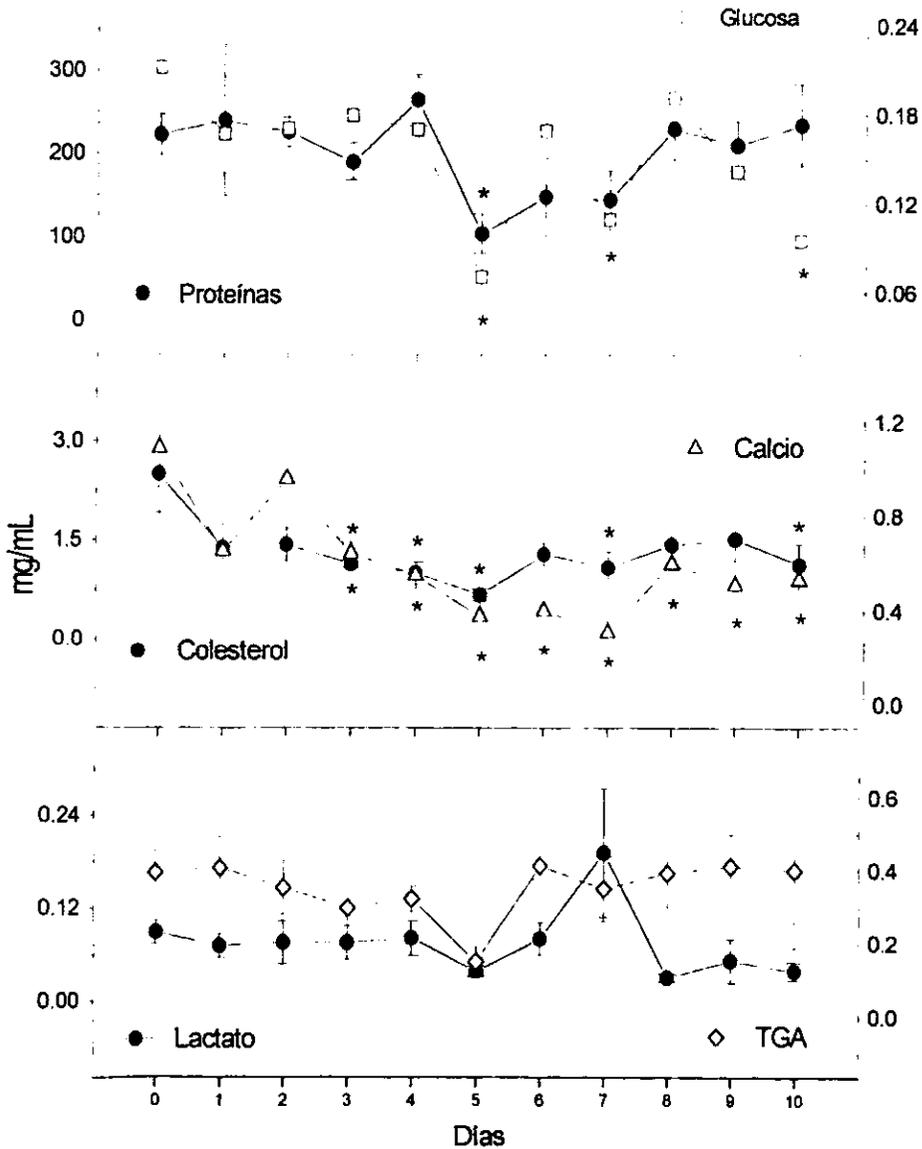


Figura 7. Comportamiento diario de la concentración de proteínas y glucosa (A), colesterol y calcio (B), y de lactato y triacilglicéridos (TGA) (C) en la hemolinfa de los machos de *Litopenaeus setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C. Valor promedio \pm E.S. * indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

2c. Parámetros fisiológicos y bioquímicos

Los niveles de glucosa y proteínas en la hemolinfa disminuyeron significativamente en el día cinco con respecto al día cero ($P < 0.05$). Posteriormente se observó una elevación en la concentración de ambos parámetros en el día seis. Nuevamente una reducción significativa fue observada en los niveles de glucosa en el día siete y diez (Figura 7).

La concentración de calcio disminuyó un 43% a partir del día dos y no logro recuperarse durante el bioensayo ($P < 0.05$) (Figura 7). Los niveles de colesterol se vieron disminuidos a partir del tercer día en un 47%, el día seis se recupera 27% pero para el termino del experimento el nivel es 54% menor al valor inicial. Por otro lado, las fluctuaciones de lactato y triacilglicéridos resultaron similares entre sí, pero sin diferencias significativas entre los días, aun así, fue posible observar un decaimiento en el día cinco (Figura 7).

La CO-HIPO varió durante el experimento, mostrando diferencias significativas entre los días pero no con el valor inicial (Figura 8). Los días tres, cuatro, siete y diez la CO-HIPO disminuyó significativamente, sin embargo, en los días cinco y nueve se observaron aumentos significativos ($P < 0.05$).

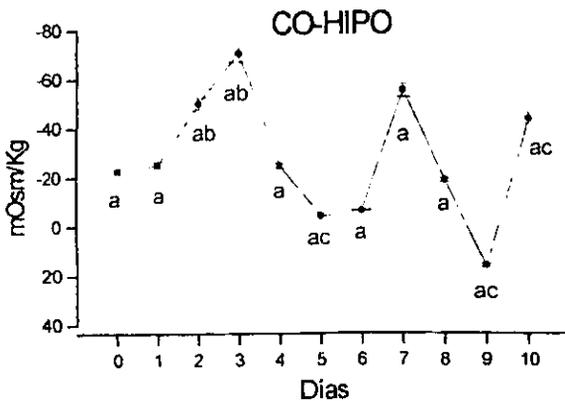


Figura 8. Seguimiento diario de la capacidad osmótica hipo de los machos mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C. Valor promedio \pm E.S. Promedio seguido por diferentes letras indica diferencia significativa ($P < 0.05$)

d) Análisis de correlaciones

1d. Aspecto reproductivo

El peso de los machos de *L. setiferus* reveló correlaciones positivas con el peso del espermátforo (r de 0.49) y con el porcentaje de espermatozoides normales (r de 0.38). Las asociaciones nuevas con respecto a la línea base fueron las encontradas con calcio y glucosa. El calcio presentó una correlación positiva con el número de espermatozoides por espermátforo (r de 0.38) y al porcentaje de espermatozoides normales (r de 0.4). Mientras que la correlación entre la glucosa y el peso del espermátforo derecho fue negativa (r de -0.35). El resto de las asociaciones encontradas en los parámetros reproductivos del grupo de línea base (Tabla 5), no se mostraron para el grupo de machos de *L. setiferus* expuestos a alta temperatura (Tabla 10).

2d. Aspecto fisiológico

La CO-HIPO presentó correlación negativa con los HT (r de -0.30). Las correlaciones encontradas en la línea base entre la CO-HIPO y las células sanguíneas y germinales (Tabla 5) no fueron observadas en los machos expuestos a 33 °C (Tabla 10), a excepción de la correlación observada con los espermatozoides muertos (r de 0.37).

Los metabolitos en general mostraron mayor número de asociaciones. Al igual que en la línea base, los triacilglicéridos se correlacionaron de manera positiva con el colesterol y con el lactato (r de 0.38 y 0.33); la glucosa con las proteínas y con el calcio (r de 0.35 y 0.40) y también el ion calcio con las proteínas (r de 0.41). Las asociaciones nuevas con respecto a la línea base fueron las de triacilglicéridos con glucosa (r de 0.38), glucosa con colesterol (r de 0.28), finalmente las correlaciones del colesterol con el calcio y con las proteínas (r de 0.61 y 0.3) (Tabla 10).

3d. Aspecto inmunológico

De manera similar a la línea base los HT mostraron asociaciones con todos los subtipos celulares (CG, CSG, CH) donde el coeficiente de correlación osciló de 0.91 a 0.74. A su vez las CG se encontraron correlacionadas a los otros dos grupos de células, CSG (r de 0.67) y CH (r de 0.65). Las CSG mostraron asociaciones con las CH (r de 0.76) y con el valor obtenido de dividir la actividad de fenoloxidasa total entre los hemocitos totales (proFO+FO/HT) (r de 0.39). La razón de proFO+FO/HT reveló nuevas asociaciones en comparación a la línea base, por un lado con los HT (r de 0.36) y las CH (r de 0.51) y

por otro también se encontró correlacionada a dos metabolitos: triacilglicéridos y colesterol donde la r se registró en 0.31 y 0.28, respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Correlaciones significativas encontradas entre los parámetro reproductivos, fisiológicos e inmunes de machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C.

| Cautiverio a 33 °C | g.l | r | r ² | P |
|--|-----|------|----------------|-------|
| Peso vs | | | | |
| % Espermatozoide (F) normales (arseno) | 36 | 0.38 | 0.148 | 0.016 |
| Espermatóforo derecho (mg) (log) | 38 | 0.49 | 0.244 | 0.001 |
| CO-HIPO vs | | | | |
| HT (células mm ³) | 40 | 0.30 | 0.09 | 0.04 |
| % E. Muertos (arseno) | 35 | 0.37 | 0.14 | 0.02 |
| Hemocitos totales vs | | | | |
| CG (células mm ³) | 40 | 0.74 | 0.55 | 0.001 |
| CSG (células/mm ³) | 40 | 0.79 | 0.63 | 0.001 |
| CH (células mm ³) | 40 | 0.91 | 0.83 | 0.001 |
| proFO + FO HT | 39 | 0.36 | 0.13 | 0.018 |
| CG vs | | | | |
| CSG (células/mm ³) | 40 | 0.67 | 0.451 | 0.001 |
| CH (células/mm ³) | 40 | 0.65 | 0.424 | 0.001 |
| CSG vs | | | | |
| CH (células/mm ³) | 40 | 0.76 | 0.583 | 0.001 |
| proFO + FO HT | 36 | 0.39 | 0.154 | 0.01 |
| CH vs | | | | |
| proFO + FO HT | 36 | 0.51 | 0.26 | 0.001 |
| proFO+FO/HT vs | | | | |
| Triacilglicéridos (mg ml.) | 54 | 0.31 | 0.095 | 0.02 |
| Colesterol (mg/mL) | 54 | 0.28 | 0.08 | 0.02 |
| Triacilglicéridos vs | | | | |
| Glucosa (mg/mL) | 56 | 0.38 | 0.142 | 0.003 |
| Colesterol (mg/mL) | 56 | 0.38 | 0.145 | 0.003 |
| Lactato (mg/mL) | 55 | 0.33 | 0.112 | 0.01 |
| Glucosa vs | | | | |
| Colesterol (mg mL) | 56 | 0.28 | 0.08 | 0.02 |
| Calcio (mg mL) | 52 | 0.40 | 0.16 | 0.002 |
| Espermatóforo derecho (mg) (log) | 35 | 0.35 | 0.12 | 0.03 |
| Colesterol vs | | | | |
| Calcio (mg mL) | 52 | 0.61 | 0.37 | 0.001 |
| Proteínas (mg mL) (log) | 56 | 0.30 | 0.09 | 0.021 |
| Calcio vs | | | | |
| Proteínas (mg mL) (log) | 52 | 0.41 | 0.17 | 0.001 |
| % E. Normales (arseno) | 52 | 0.40 | 0.159 | 0.017 |
| E. totales medio espermatóforo (log) | 33 | 0.38 | 0.148 | 0.02 |

Discusión

En la presente investigación se utilizó como marco de referencia la caracterización de una población de machos de *L. setiferus* recién capturados, y a partir de ella fue posible determinar que las alteraciones fisiológicas generadas durante el proceso de aclimatación, manifestaron cambios a nivel de los sustratos energéticos, del sistema inmune y de la calidad reproductiva en los machos mantenidos en cautiverio durante diez días a 33 °C .

I. Línea base

Las características morfofisiológicas de una población de crustáceos son función de las condiciones ecológicas en las que los organismos han estado expuestos durante su ciclo de vida (Vernberg, 1983). Por esta razón se consideró que la línea base establecida ahora, podría reflejar el estado fisiológico de la población de machos adultos de camarón durante el segundo pico reproductivo de 1998 (meses de septiembre a noviembre). Estudios de ecología pesquera realizados en la década de los 80's en la Sonda de Campeche han demostrado la existencia de un reclutamiento continuo de la población de reproductores, con un máximo en agosto-septiembre, aproximadamente cuatro meses después del primer pico de desove de *L. setiferus* (Guitar y Quintana, 1978). Durante los bioensayos los niveles de salinidad y temperatura variaron entre 29 a 31 ‰ y de 26 a 31 °C, los cuales coinciden con las fluctuaciones naturales de las estaciones climáticas correspondientes a los meses de captura: lluvias (agosto-octubre) y nortes (octubre-noviembre).

El peso de los organismos y la calidad espermática se emplean comúnmente como criterios de selección de machos adultos en la industria camaronícola. En *L. setiferus*, se han encontrado organismos maduros desde los 18 g, pero la talla mínima de madurez sexual ha sido señalada a partir de los 23 g y longitudes mayores de 16 cm (Fajer, 1992). Sin embargo, la uniformidad en los estados de desarrollo y en la producción de espermatozoides se puede esperar en organismos mayores a 30 g y el máximo potencial reproductivo en organismos con peso superior a los 36 g (Rosas *et al.*, 1993). En el presente estudio el peso promedio de los organismos utilizados para determinar la línea base fue de 33.9 ± 0.09 g (Anexo 4), en los cuales el peso del espermátforo y el porcentaje de espermatozoides

normales no presentaron diferencias significativas entre los meses de captura (septiembre a noviembre) ($P > 0.05$)

Al comparar los resultados de calidad reproductiva de los machos de *L. setiferus* recién capturados con un estudio realizado con machos de la misma especie de peso muy similar (34.3 g), efectuado durante los meses de mayo a julio de 1994 (Pascual *et al.*, 1998), se observó que la concentración de espermatozoides totales y normales reportada ahora es 53% menor a la observada en 1994. Si la condición reproductiva de los camarones puede ser considerada como un indicador del estado general de las poblaciones de *L. setiferus* para esta área durante los meses correspondientes, los resultados obtenidos en el presente estudio ponen en evidencia que existe alguna alteración posiblemente de carácter ambiental y/o genética, o ambas, que ha reducido la capacidad reproductiva de la población la cual se ve reflejada en una disminución de la calidad espermática para 1998.

Las evaluaciones de letalidad a nivel poblacional incluyen precisamente las alteraciones a nivel reproductivo (Prosser, 1950), por lo cual resulta de enorme importancia realizar estudios enfocados a determinar el estado de la población de reproductores de *L. setiferus* desde un punto de vista integral, que permita asociar la capacidad reproductiva con factores climáticos y bióticos como la actividad pesquera y petrolera, las cuales son especialmente fuertes en la Sonda de Campeche. Particularmente enfocado a la calidad espermática deben de ser considerados los plaguicidas, La Laguna de Términos es un área sujeta a un continuo aporte de contaminantes provenientes de los sistemas fluviales donde han sido detectados plaguicidas (Rosales *et al.*, 1979). Ahora se tiene conocimiento sobre la actividad estrogénica de los plaguicidas organoclorados como el DDT, Endosulfán, Dieldrín, en varias especies de vertebrados (Sharpe y Skakkebaek, 1993; Soto *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1996). La capacidad de persistencia de estos químicos en los suelos es alta, por lo cual existe la posibilidad de que organismos bentónicos como el camarón los bioacumulen como ya lo detectaron (Murray y Beck, 1990) en *L. setiferus* y *Farfantepenaeus aztecus*.

Los ritmos fisiológicos y de comportamiento de los organismos marinos están íntimamente relacionados con la marea y las fluctuaciones de las variables ambientales. La actividad locomotora, el consumo de oxígeno y los cambios de color son algunas de las funciones biológicas que muestran ciclos circadianos (Rosas *et al.*, 1992a; Rosas *et al.*, 1992b; Bolongaro-Crevenna, 1997), sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado el comportamiento de los componentes bioquímicos en la hemolinfa y de los elementos del sistema inmune desde esta perspectiva en reproductores de *L. setiferus*. Puesto que

la hemolinfa es considerada el tejido de transporte y en algunos casos de reserva de macromoléculas de importancia energética y metabólica, en el presente estudio se utilizaron los componentes de la hemolinfa como indicadores del estado fisiológico de los camarones.

Se realizaron seguimientos de 24 h, con el propósito de conocer las fluctuaciones de algunos componentes de la hemolinfa en los machos recién capturados. Sólo se encontraron diferencias significativas entre los niveles de triacilglicéridos (TGA) y de lactato, entre el inicio y el final del ciclo de 24 h ($P < 0.05$) (Figura 3). Tomando en cuenta que los organismos se mantuvieron sin alimentación durante el transcurso de las mediciones, el aumento observado en los niveles de lactato y de TGA no fueron generados por la ingesta y pueden ser explicados a partir de los ajustes en el metabolismo de carbohidratos y de lípidos. De acuerdo con Angus (1989), en larvas de crustáceos la composición lipídica puede ser considerada como un índice de condición, pues frecuentemente los animales sometidos a un estrés ambiental son incapaces de obtener suficiente energía de fuentes exógenas. Como consecuencia, la energía de reserva es catabolizada para mantener el metabolismo basal. Por lo cual, el almacén de TGA tiene una importancia particular ya que ha sido asociado a la condición fisiológica del organismo.

De acuerdo a Vinagre y Da Silva (1992), en cangrejos (*Chasmagnathus granulata*) mantenidos durante ocho semanas sin alimentación, el ajuste de los metabolitos evaluados (glucosa, glucógeno y lípidos totales en hemolinfa y en tejidos) fue relacionado al tipo de dieta al que fueron adaptados los organismos antes de estar expuestos al período de inanición (dieta alta en carbohidratos: AC; y dieta alta en proteínas: AP). Durante la segunda semana de inanición, se observó un aumento en la concentración de lípidos en la hemolinfa del 100% en los organismos adaptados a la dieta de AP y del 40% para los cangrejos adaptados a la dieta de AC, en comparación con los organismos alimentados. La disminución de los lípidos del hepatopáncreas y del músculo al final del período experimental de estos cangrejos, fue relacionado con la energía consumida derivada del catabolismo del hepatopáncreas y de los lípidos del músculo.

En los machos recién capturados se registró un incremento en los TGA mayor al 100% en las últimas horas de ciclo de 24 h (aproximadamente 42 h después de ser capturados) (Figura 3), revelando que durante el proceso de aclimatación a las condiciones de cautiverio, los organismos ajustan el metabolismo de los lípidos posiblemente para abastecer la demanda energética ocasionada por el estrés generado durante la manipulación y el transporte. Esto último coincide con la reabsorción observada en

las gónadas de las hembras maduras (estado IV) de *L. setiferus*, del día de la captura a la siguiente mañana (Alfaro, 1990). El aumento de los TGA en la hemolinfa de los machos recién capturados puede ser resultado de la degradación del tejido gonádico. Aunque la proporción de lípidos es menor en las gónadas masculinas que en las femeninas para *L. setiferus* el 5% de los testículos está constituido por lípidos (Castille y Lawrence, 1989).

De acuerdo a Paterson (1993), el lactato es un indicador del metabolismo anaerobio y por tanto ha sido utilizado como índice de estrés en camarones peneidos. Así mismo se ha relacionado con el metabolismo de los carbohidratos, reflejando la condición nutricional de los organismos. Durante el ciclo de 24 h de los machos recién capturados se observó un aumento significativo en los niveles de lactato en hemolinfa, hacia el final del periodo de muestreo, el cual puede estar asociado con el uso de reservas bajo condiciones de estrés pues la manipulación generada por la obtención aleatoria de los organismos durante el muestreo puede representar a su vez una presión sobre el estado fisiológico general de los organismos. A pesar de intentar ocasionar el menor disturbio en los tanques, los organismos capturados al final del ciclo de 24 h estuvieron expuestos por más tiempo al efecto del muestreo y por tanto al estrés provocado por éste y por la condición de ayuno, lo cual nos hace pensar que los niveles de lactato registrados ahora son más bien un reflejo del procedimiento de muestreo más que una variación circadiana asociada con la movilización de nutrientes de uso energético o fisiológico.

Durante el estrés los organismos utilizan a los carbohidratos como fuente de energía metabólica. Como resultado de este proceso se produce lactato el cual entra al ciclo de los ácidos tricarbónicos y a la fosforilación oxidativa (Zubay, 1983) donde el oxígeno es el último aceptor de electrones. El producto final de esta reacción es $ATP + H_2O + CO_2$. Si el estrés es continuo, la cantidad de lactato producido puede ser mayor que la capacidad del organismo de oxidarlo lo cual conduce a su acumulación en el músculo, indicando que los organismos han aumentado su metabolismo anaerobio. Una vez acumulado, el lactato es incorporado en la hemolinfa, la cual funciona como un almacén que impide que los cristales de ácido láctico dañen los tejidos musculares de los camarones (Spotts y Lutz, 1981; Paterson, 1993). Esto último explica las razones por las cuales los niveles de lactato de los camarones fueron mayores en los animales muestreados al final del ciclo de 24 h.

El resto de los componentes bioquímicos de la hemolinfa evaluados en los organismos de línea base revelaron diferentes comportamientos. Cuando se compararon las concentraciones de glucosa de organismos provenientes de diferentes capturas no se observaron diferencias significativas, el valor

promedio encontrado fue de 0.21 mg/mL ($P > 0.05$). Por su parte, las concentraciones de proteínas, colesterol y calcio en la hemolinfa fluctuaron significativamente entre los organismos provenientes de diferentes capturas. A pesar de mantener a los camarones de la línea base, en ayuno durante los bioensayos, con el propósito de evitar la alteración asociada al proceso de digestión y asimilación del alimento, es posible que la historia alimenticia de los organismos y los eventos previos a la captura determinen los niveles en la hemolinfa de los metabolitos y del calcio. Se ha observado que en camarones alimentados a partir de dietas con diferentes niveles de proteínas, carbohidratos y triacilglicéridos, las concentraciones de los metabolitos en distintos tejidos están relacionadas con el tipo de dieta (Gleecross y Smith, 1997, Rosas *et al.*, 2000a). La relación entre el metabolismo de carbohidratos y el de proteínas ha sido observada en juveniles de *L. setiferus* y *L. vannamei* mostrando que los camarones tienen una alta plasticidad para utilizar las proteínas dietéticas, como fuentes de energía y a partir de la ruta gluconeogénica producir glucosa y glucógeno (Rosas *et al.*, 2000b). Por lo tanto no es extraño encontrar diferencias significativas entre las capturas en los niveles de proteína pero no en los niveles de glucosa.

Estos resultados ponen en evidencia que los camarones de las poblaciones naturales requieren de un nivel mínimo de glucosa para satisfacer las demandas de energía metabólica, el cual debe de mantenerse independientemente a las variaciones nutricionales a las que pudieran estar expuestos. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio con juveniles de *L. vannamei* alimentados con niveles muy bajos de carbohidratos dietéticos (1%), han demostrado la capacidad de los camarones para mantener un nivel mínimo de glucosa en sangre (0.34 mg/mL), el cual es muy cercano al reportado en el presente estudio, demostrando una vez más la alta capacidad de los camarones para la síntesis *de novo* de este sustrato (Rosas *et al.*, 2000a). La asociación positiva encontrada entre los niveles de proteínas y de glucosa en los organismos de línea base (Tabla 5) podría ser función de la interacción entre las rutas metabólicas involucradas en la conversión de amino ácidos en glucosa o glucógeno aportando aún más datos a esta hipótesis.

Con respecto al colesterol se ha aceptado en general que los crustáceos carecen de la capacidad para sintetizarlo *de novo* y es a partir del suministro dietético que logran abastecer su requerimiento para crecer y reproducirse (Teshima *et al.*, 1997). Considerando esto último, las fluctuaciones de colesterol en los machos de *L. setiferus* recién capturados están directamente relacionadas con el tipo y la cantidad de alimento consumido antes de ser capturados.

las gónadas de las hembras maduras (estado IV) de *L. setiferus*, del día de la captura a la siguiente mañana (Alfaro, 1990). El aumento de los TGA en la hemolinfa de los machos recién capturados puede ser resultado de la degradación del tejido gonádico. Aunque la proporción de lípidos es menor en las gónadas masculinas que en las femeninas para *L. setiferus* el 5% de los testículos está constituido por lípidos (Castille y Lawrence, 1989).

De acuerdo a Paterson (1993), el lactato es un indicador del metabolismo anaerobio y por tanto ha sido utilizado como índice de estrés en camarones peneidos. Así mismo se ha relacionado con el metabolismo de los carbohidratos, reflejando la condición nutricional de los organismos. Durante el ciclo de 24 h de los machos recién capturados se observó un aumento significativo en los niveles de lactato en hemolinfa, hacia el final del periodo de muestreo, el cual puede estar asociado con el uso de reservas bajo condiciones de estrés pues la manipulación generada por la obtención aleatoria de los organismos durante el muestreo puede representar a su vez una presión sobre el estado fisiológico general de los organismos. A pesar de intentar ocasionar el menor disturbio en los tanques, los organismos capturados al final del ciclo de 24 h estuvieron expuestos por más tiempo al efecto del muestreo y por tanto al estrés provocado por éste y por la condición de ayuno, lo cual nos hace pensar que los niveles de lactato registrados ahora son más bien un reflejo del procedimiento de muestreo más que una variación circadiana asociada con la movilización de nutrientes de uso energético o fisiológico.

Durante el estrés los organismos utilizan a los carbohidratos como fuente de energía metabólica. Como resultado de este proceso se produce lactato el cual entra al ciclo de los ácidos tricarbónicos y a la fosforilación oxidativa (Zubay, 1983) donde el oxígeno es el último aceptor de electrones. El producto final de esta reacción es $ATP + H_2O + CO_2$. Si el estrés es continuo, la cantidad de lactato producido puede ser mayor que la capacidad del organismo de oxidarlo lo cual conduce a su acumulación en el músculo, indicando que los organismos han aumentado su metabolismo anaerobio. Una vez acumulado, el lactato es incorporado en la hemolinfa, la cual funciona como un almacén que impide que los cristales de ácido láctico dañen los tejidos musculares de los camarones (Spotts y Lutz, 1981; Paterson, 1993). Esto último explica las razones por las cuales los niveles de lactato de los camarones fueron mayores en los animales muestreados al final del ciclo de 24 h.

El resto de los componentes bioquímicos de la hemolinfa evaluados en los organismos de línea base revelaron diferentes comportamientos. Cuando se compararon las concentraciones de glucosa de organismos provenientes de diferentes capturas no se observaron diferencias significativas, el valor

mayormente a las funciones fisiológicas que desempeñan las células como podría ser el almacenamiento de glucógeno. Sobre las posibles funciones del almacenamiento de glucógeno en los hemocitos han sido consideradas dos posibilidades; podría representar unidades de hexosa para la síntesis de quitina o como fuente de glucosa sanguínea (Jonhston y Spencer, 1972, Hall y van Ham, 1998).

La muda es un importante evento metabólico y morfológico en los crustáceos, durante la cual se han observado importantes variaciones en los componentes de la hemolinfa. De acuerdo a Le Moullac *et al.* (1997), las variaciones hematológicas y los cambios en el sistema profenoloxidasa durante la muda pueden ser correlacionadas con la resistencia a la vibriosis, ya que durante el estado de intermuda la sobrevivencia de los camarones fue significativamente mayor al igual que la actividad de fenoloxidasa. Estudios sobre las variaciones en la hemolinfa durante el proceso de muda revelan que en la premuda (D), se observan los mayores niveles séricos de proteínas y de ecdisteroides, lo cual concuerda con los cambios fisiológicos en preparación de la próxima muda. Mientras que el máximo nivel de glucosa se encuentra durante la intermuda, coincidiendo con el crecimiento del tejido y el almacenamiento de reservas (Chan *et al.*, 1988). Los resultados anteriores coinciden con el comportamiento de los componentes de la hemolinfa registrados en los machos de *L. setiferus* en estado de intermuda, en los cuales los niveles hematológicos fueron mayores, así como las concentraciones de TGA, de la glucosa, del colesterol y del lactato (Tabla 2). Considerando lo anterior para el análisis de correlaciones y la obtención de intervalos de los metabolitos, el conteo y la caracterización de las células hemáticas y la actividad de fenoloxidasa de los machos de *L. setiferus* recién capturados sólo se consideraron a los camarones en estado de intermuda (C).

Desde la perspectiva de la camaronicultura los cambios en las características morfofisiológicas que pudieran estar correlacionados con eventos importantes durante el ciclo de vida de los camarones, resultan de gran importancia debido a su posible utilización como herramientas de diagnóstico. En los machos de *L. setiferus* recién capturados se encontraron algunas correlaciones interesantes entre los evaluaciones realizadas.

El peso de los organismos reveló correlaciones positivas con el peso del espermatóforo y el porcentaje de espermatozoides totales (Tabla 5), lo cual concuerda con estudios anteriores en donde se ha observado una asociación directa entre la capacidad reproductiva y el peso del reproductor (Leung-Trujillo y Lawrence, 1991; Pratomchat *et al.*, 1993). El incremento observado en el conteo de

espermatozoides y la reducción de espermatozoides anormales en relación a la talla, parece ser una característica del proceso de maduración de los camarones peneidos (Rosas *et al.*, 1993). En organismos jóvenes es frecuente observar mayor número de espermatozoides anormales, lo cual ha sido explicado como un desfase en la maduración de los testículos y del vaso deferente, en el cual se terminan de madurar los espermatozoides al completarse la formación de la cola (Alfaro, 1993). Los resultados de esta investigación revelan que el 22% de los organismos presentaron una marcada incidencia de espermatozoides anormales, en su mayoría caracterizados por la ausencia de la espina, reflejando posiblemente células germinales inmaduras. El 21% de los organismos recién capturados no presentaron espermátforo y sólo en el 35% de los machos, el porcentaje de espermatozoides normales fue mayor a cero. Esto último, concuerda con la observación realizada sobre la disminución de la calidad reproductiva de este grupo de machos en comparación con los evaluados en 1994.

La asociación significativa entre el peso del espermátforo y las evaluaciones de calidad espermática (Tabla 5), revela la relación funcional existente entre los diferentes componentes del espermátforo y la masa espermática. Los espermátforos de los decápodos son formados cuando los espermatozoides pasan de los testículos al vaso deferente distal, una vez ahí, las células son rodeadas por secreciones epiteliales que consolidan la masa espermática, la cual está compuesta de células germinales y secreciones que forman las paredes acelulares del espermátforo (Krol *et al.*, 1992). La actividad de la cópula culmina con la transferencia del espermátforo compuesto, el cual se une a la hembra por un plato dorsal fibroso, la capa accesoria fibrosa y el material pegajoso, mientras que la porción anterior se ancla por medio de las alas (Chow *et al.*, 1991). En un estudio realizado con *Penaeus monodon* se observó una gran asociación entre el peso del espermátforo y el porcentaje de huevos fecundados y de nauplios obtenidos a partir de inseminación artificial (Pratomchat *et al.*, 1993).

Observaciones histoquímicas revelan que la pared del tubo del espermátforo, a nivel del vaso deferente, consiste de mucopolisacáridos neutrales, mientras que los componentes del espermátforo son ricos en mucopolisacáridos ácidos (Radha y Subramoniam, 1985). Tomando en cuenta esto, se evaluó el contenido de glucógeno en la masa espermática y la matriz gelatinosa (Anexo 4 y 5), sin embargo las concentraciones obtenidas no pudieron ser relacionadas con la calidad espermática. Posiblemente la técnica de medición de glucógeno empleada no logra percibir las fluctuaciones en los mucopolisacáridos relacionados con el desarrollo gonádico en los machos recién capturados y las alteraciones reproductivas observadas en los machos mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C.

Continuando con los elementos reproductivos de los machos recién capturados, tanto el porcentaje de espermatozoides normales como el de anormales mostró correlación significativa con el nivel de triacilglicéridos y de colesterol, siendo la correlación positiva para células normales y negativa para los anormales (Tabla 5). Los lípidos plasmáticos se encuentran involucrados tanto en el metabolismo energético como en la formación de membranas y de hormonas durante los procesos de crecimiento y reproducción. Así mismo para el desarrollo gonadal el colesterol es importante como precursor de hormonas esteroideas (Teshima *et al.*, 1997). En el cangrejo azul, *Callinectes sapidus* la esteroideogénesis ha sido demostrado por la conversión de 11-progesterona a testosterona en homogenados de la glándula androgénica. La glándula androgénica de crustáceos es la unidad encargada de la producción de hormonas que determinan la masculinidad y posiblemente participa durante el proceso de maduración de los espermatozoides (Browdy, 1992; Alfaro, 1994). Desde el punto de vista práctico, la correlación encontrada entre estos parámetros plasmáticos y la condición reproductiva de los machos podría ser de utilidad en los laboratorios de producción de postlarvas, como posible indicador de la capacidad reproductiva de los machos.

La relación existente entre los lípidos evaluados y la condición reproductiva de los machos también fue observada en el análisis comparativo entre los machos recién capturados con presencia y ausencia de espermátforo (Tabla 3). Los niveles de colesterol, l'GA y glucosa en los organismos sin espermátforo fueron significativamente mayores ($P < 0.05$), posiblemente una mayor demanda de estos sustratos durante el proceso de regeneración del espermátforo esté relacionado a menores concentraciones en el torrente sanguíneo o hemolinfa.

La comparación de los niveles bioquímicos entre hembras de *L. vannamei* de pocos y múltiples desoves reveló que los niveles de TGA, proteínas totales y carbohidratos en la hemolinfa y proteínas en el ovario fueron mayores en las hembras con muchos desoves, lo cual fue asociado a una mayor eficiencia de asimilación, almacenaje y movilización de nutrientes (Palacios *et al.*, 1999). Esto último concuerda con la idea de que los machos durante el proceso regenerativo del espermátforo pudieran presentar mayor uso de los sustratos metabólicos, pero es necesario medir los índices bioquímicos a nivel de tejido para determinar el destino y almacenaje de los nutrientes. Sin embargo, los métodos utilizados en este trabajo pudieran representar una forma rápida y económica de hacer una evaluación de la movilización de sustratos de importancia reproductiva.

Castille y Lawrence (1989), estudiaron los patrones de movilización de los nutrientes tomando en cuenta las estrategias reproductivas de los camarones del Atlántico. En *L. setiferus*, una especie que habita en aguas costeras se observó una mayor movilización de los lípidos hacia las gónadas a diferencia de *F. aztecus* que habita en aguas más profundas y por la tanto que enfrenta condiciones menos fluctuantes, en donde la movilización de los lípidos hacia la gónada fue mucho menor. Estos resultados ponen en evidencia que el alimento, más que las reservas orgánicas, podría ser la fuente de nutrientes más importante para la maduración en *F. aztecus*. En el mismo estudio el índice de proteínas, carbohidratos y lípidos fue mayor en los testículos de *L. setiferus*, pero mayores en el vaso deferente y el ámpula terminal de *F. aztecus*. Es probable que estos índices, estén relacionados con el proceso de la maduración de los espermatozoides, antes de ser transferidos a la hembra en el caso de las especies de tético abierto y dentro del receptáculo para las especies de tético cerrado. Estos resultados revelan que la movilización de los nutrientes en los reproductores esta íntimamente relacionada con el proceso de maduración gonadal, para los machos evaluados ahora correspondería con la regeneración del espermatóforo.

En el presente estudio se observaron correlaciones significativas entre los metabolitos y la capacidad osmótica (CO-HIPO) de los camarones de la línea base (Tabla 5). En el caso de la glucosa y del colesterol la asociación con la CO-HIPO podría ser originada durante el tránsito de las moléculas orgánicas de origen alimentario a la hemolinfa (Lignot *et al.*, 1999). En cuanto a la correlación encontrada entre la CO-HIPO con las proteínas y con el calcio, podría estar asociada con el papel que tienen ambos como componentes osmóticamente activos, los cuales pueden aumentar o disminuir la osmolaridad de la hemolinfa (Ferraris *et al.*, 1994). En un estudio realizado con juveniles de *L. vannamei* y *L. setiferus* alimentados con diferentes niveles de proteínas y expuestos a distinta salinidad (15 y 40 ‰), la concentración del amonio interno y de proteínas en la hemolinfa, junto con la actividad de la glutamato deshidrogenasa, enzima clave en la deaminación oxidativa de los amino ácidos, indican que los amino ácidos provenientes de la degradación de las proteínas dietéticas fueron utilizados para la regulación osmótica en los organismos mantenidos a 15 ‰, en los cuales se obtuvo el mejor crecimiento (Rosas *et al.*, 2000a).

De acuerdo a Claybrook (1983) muchas especies eurihalinas responden al cambio de salinidad en el medio, por medio de alteraciones en el contenido de amino ácidos libres (AAL) de sus tejidos, la generalidad de esta respuesta indica una disminución especialmente de glicina, prolina, alanina y glutamato en los tejidos, la disminución es seguida por un aumento de los AAL en la hemolinfa. Esta

disminución en el pool de AAL, pudiera deberse a su excreción, a su incorporación a proteínas o a péptidos, o al catabolismo, ya sea por oxidación total o por la conversión a otros constituyentes. La asociación significativa entre la CO-HIPO y los hemocitos (CG y CSG) registrada en los machos recién capturados (Tabla 5), pudiera revelar la participación de los amino ácidos de los hemocitos en la regulación osmótica de la hemolinfa. Para *C. maenas* se ha establecido que cerca de la mitad del total de AAL está localizado dentro de los hemocitos (Claybrook, 1983).

La autorregulación es el principal atributo de la materia viviente, la cual se realiza por medio de mecanismos homeostáticos en el sentido utilizado por Claude Bernard, donde el control homeostático representa una ventaja adaptativa, puesto que el rango de influencia externa que un organismo puede tolerar depende de la capacidad amortiguadora de sus mecanismos compensatorios y donde el grado del control homeostático determina la explotación y la radiación de las especies en el ambiente (Sima y Vétvicka, 1990). Desde este punto de vista integral, las correlaciones encontradas entre la capacidad osmótica con las células espermáticas (normales, anormales y muertos) pudieran ser consideradas de forma homeostática ya que la capacidad osmótica ha sido propuesta como un indicador del estado fisiológico de los camarones, que permite revelar modificaciones fisiológicas reversibles como consecuencia de estrés no letal de poca duración (Aquacop *et al.*, 1992).

Las correlaciones entre los diferentes tipos de hemocitos y el número total de hemocitos (Tabla 5), pudiera reflejar la interrelación entre la concentración de los subtipos celulares y los procesos de origen hematopoyético que permiten mantener los niveles de hemocitos para llevar a cabo las diversas funciones fisiológicas e inmunes. La correlación entre las células semigranulares y la actividad de fenoloxidasa total (Fo+proFo/TH) debe obedecer a la localización de los elementos del sistema fenoloxidasa en las células granulares de los crustáceos (Ashida y Söderhäll, 1984; Johansson y Söderhäll, 1985), por lo que las correlaciones observadas son posibles en términos de la funcionalidad de estos procesos.

II. Organismos mantenidos en cautiverio

El deterioro de la calidad reproductiva en los machos de camarón mantenidos en cautiverio ha sido investigada ampliamente (Brown *et al.*, 1979; Chamberlain *et al.*, 1983; Talbot *et al.*, 1989; Alfaro, 1993; Pratoomchat *et al.*, 1993). Los estudios hasta ahora indican que la disminución de la condición

gonadal de los machos es común, pero que el camarón blanco del Golfo de México, *L. setiferus* parece ser más susceptible que otras especies (Bray *et al.*, 1985; Leung-Trujillo y Lawrence, 1991).

La observación de que los reproductores en los sistemas de cultivo frecuentemente estaban expuestos a mayores temperaturas que en la naturaleza, marcó el preámbulo de algunas investigaciones acerca de su efecto sobre la calidad reproductiva (Bray *et al.*, 1985). Hasta ahora, se ha evaluado el efecto de la temperatura sobre la degeneración (26 °C y 30 °C) y la regeneración del espermatóforo (25 °C, 30 °C y 33 °C) de los machos adultos de *L. setiferus* (Pascual *et al.*, 1998). Los resultados revelan que durante 30 días, los camarones mantenidos en la menor temperatura (27 °C) no presentan el SDARM, a diferencia de aquellos que estuvieron en 31°C y 33 °C, en los cuales estuvo presente tanto el síndrome de degeneración como el de melanización, siendo de mayor magnitud en la mayor temperatura. Por lo tanto, en la presente investigación se utilizó la temperatura de 33 °C como un mecanismo activador, con la intención de acelerar las alteraciones frecuentemente observadas en los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio (aproximadamente de dos a tres semanas) a menor temperatura, y así poder evaluar variables metabólicas e inmunes en relación al deterioro de la calidad reproductiva.

Para los organismos poiquilotermos, la temperatura es un factor controlador de las funciones metabólicas que afecta de manera directa la actividad enzimática y los requerimientos de energía (Fry, 1947). Los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C mostraron un incremento significativo en el porcentaje de alimento consumido con respecto al tiempo (Tabla 5), el cual concuerda con los resultados obtenidos en *Palaemonetes pugio*, donde el incremento en la tasa de ingestión estuvo asociado al aumento de la temperatura (15 a 18 °C) (Vernberg y Piyatiratitivorakul, 1998). En un estudio paralelo realizado con machos de *L. setiferus* expuestos a 27 °C y 31 °C se pudo observar que la cantidad de alimento ingerido y la tasa de absorción de energía aumentaron con relación a la temperatura y al tiempo de aclimatación (5 días), indicando que los procesos de obtención de energía se incrementan conforme los organismos se ajustan al ambiente de cultivo (Sánchez, 2000).

Si bien la temperatura acelera la tasa de ingestión, la asimilación del alimento es influenciada por otros factores como la concentración y el tipo de alimento, los factores ambientales o los intrínsecos al estado fisiológico del organismo (Rosas *et al.*, 1995b; Vernberg y Piyatiratitivorakul, 1998). En el presente estudio los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio mostraron pérdida de biomasa ($P < 0.05$) a lo largo de la prueba a pesar del incremento significativo en el porcentaje de ingestión (Tabla 5). Estos resultados coinciden con el comportamiento observado en las hembras de *L. vannamei*

ablacionadas, cuya tasa de ingestión también aumentó y la pérdida de tejido observado se consideró una consecuencia del incremento de la demanda de energía impuesto por la ablación (Palacios *et al.*, 1999). En el caso de los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por diez días, el incremento de la demanda de energía puede originarse por el despliegue de mecanismos compensatorios durante el proceso de aclimatación a las condiciones del laboratorio y a la temperatura de 33 °C.

El comportamiento de los indicadores bioquímicos concuerda con la idea del uso de las reservas energéticas. En el presente estudio se observó que la concentración de glucosa se mantuvo constante (0.18 mg/mL) hasta el día cinco, cuando disminuyó un 67.4% (Figura 7). Las oscilaciones observadas a partir de ese día en los niveles de glucosa podrían revelar la activación de mecanismos de compensación que permiten mantener la concentración de glucosa observada en los organismos recién capturados (0.21 mg/mL). Estos mecanismos pudieran estar actuando en los camarones puesto que la concentración de glucosa para el día diez se restableció en un 70%. La capacidad de los camarones de habituarse a ciertas condiciones de estrés fue observada en juveniles de *P. monodon* expuesto a altas densidades. En ese estudio, los niveles de glucosa no presentaron diferencia significativa con los valores iniciales después de que los camarones estuvieron expuestos a altas densidades por cuatro semanas (Hall y van Ham, 1998). Los mecanismos de compensación observados en *P. monodon* pudieran actuar de la misma manera en *L. setiferus*, permitiendo a los camarones regular los niveles de glucosa durante el proceso de aclimatación.

La regulación del metabolismo de carbohidratos es fundamental durante la vida de los crustáceos debido a su participación en el proceso de muda, el glucógeno sirve esencialmente para la síntesis de quitina (Van Wormhoudt y Bellon-Humbert, 1996). El 86.9% de los machos de *L. setiferus* analizados en el experimento de cautiverio se encontraban en intermuda (C), etapa en la cual de acuerdo a Chan *et al.* (1988), han sido registrados los mayores niveles de glucosa en la hemolinfa, lo cual coincide con el crecimiento del tejido y el almacenamiento de las reservas. La regulación de los niveles de glucosa en la hemolinfa observada en los machos de *L. setiferus* a lo largo del experimento puede ser relacionada a estos procesos.

Los niveles de proteínas y de glucosa en la hemolinfa de los machos de *L. setiferus* fluctuaron de manera similar durante el experimento, la concentración de proteínas decae significativamente (53%) al mismo tiempo que la glucosa (Figura 7). A partir del día ocho el nivel de proteínas fue completamente restablecido indicando que los organismos fueron capaces de compensar el metabolismo de las

proteínas, así como el de los carbohidratos. Esta respuesta compensatoria fue también observada en un estudio paralelo en donde los machos adultos de *L. setiferus* expuestos a 27 °C y 31 °C, utilizaron a las proteínas como sustrato metabólico, independientemente a la temperatura y el tiempo de aclimatación (5 días), poniendo en evidencia que la cantidad de energía necesaria para la degradación de las proteínas se mantiene constante (Sánchez, 2000).

En los procesos de maduración gonádica los triacilglicéridos han sido considerados como un indicador fisiológico en camarones hembras, y en las larvas representan las reservas energéticas más importantes durante la embriogénesis (Angus, 1989; Palacios *et al.*, 1999). En los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio a 33 °C se observó una disminución en los TGA del 62% el día cinco de la prueba, lo cual podría revelar el uso de los sustratos energéticos de reserva (Figura 7). Después del día ocho los niveles de TGA en la hemolinfa logran restablecerse en un 100%, sugiriendo que por medio de la cetogénesis pudieron haber sido compensados los niveles de TGA a partir de los aminoácidos provenientes del músculo. La pérdida significativa de peso observada en estos organismos en el día nueve concuerda con esta hipótesis (Tabla 8).

El metabolismo anaerobio puede ser activado por varias razones, entre las que sobresalen la disponibilidad de oxígeno y algunas condiciones de estrés. Bajo condiciones de excesiva actividad muscular, las células trabajan anaeróticamente reduciendo el piruvato a lactato. A través de la membrana el lactato almacenado en la célula, puede ser difundido al entorno como desecho metabólico (Zubay, 1983). Para los crustáceos, los niveles de lactato en el músculo y en la hemolinfa han sido asociados a condiciones de estrés, como la manipulación y el traslado (Spotts y Lutz, 1981; Paterson, 1993). En los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio, se observó un pico en la concentración de lactato el día siete, el cual fue asociado a la necesidad de reacomodar a los organismos en las tinas experimentales la tarde del día seis (Figura 7). Dado que el nivel de lactato es restablecido para el día ocho, y coincide con la recuperación en los niveles de glucosa, es posible que el lactato en alta concentración fue reoxidado a piruvato y constituido en glucosa por la vía gluconeogénica. El valor promedio de los machos mantenidos en cautiverio por 10 días es igual al de los organismos recientemente capturados (0.08 mg/mL).

El acoplamiento de los procesos químicos involucrados en el uso de la energía, algunas veces presenta una secuencia parcial común, la cual funciona en una dirección para la síntesis (anabolismo) y en el camino opuesto para la degradación (catabolismo). Los mecanismos de control homeostático

intervienen en los procesos químicos para mantener activas las funciones celulares (Zubay, 1983). De acuerdo a Le Moullac *et al.* (1994) la expresión de tres diferentes amilasas implica que los camarones tienen una alta capacidad para degradar los carbohidratos. El uso de las proteínas y de los ácidos grasos como fuente de energía también ha sido documentada (Dall y Smith, 1986; Rosas *et al.*, 2000b). Para abastecer el incremento de la demanda metabólica en condiciones de ayuno o ante un metabolismo acelerado las proteínas tisulares son degradadas y los amino ácidos son liberados a la hemolinfa. Posteriormente los amino ácidos pueden ser desanimados y oxidados para obtener energía. Algunos amino ácidos desanimados son iguales a los productos de la glucólisis, por ejemplo, la alanina desanimada es el ácido pirúvico, el cual posteriormente puede convertirse en glucosa o en acetil-CoA que a su vez, puede polimerizarse para formar ácidos grasos (Zubay, 1983). Los niveles de proteínas, glucosa, y TGA en la hemolinfa de los machos de *L. setiferus* mantenido en cautiverio (10 días), muestran una recuperación en el día ocho (Anexo 7), la cual puede ser relacionada con el uso de las reservas del tejidos muscular, ya que se observó una disminución significativa del peso de los organismos al final de la prueba (Tabla 8).

La disminución del peso de los machos y el comportamiento de los metabolitos durante el bioensayo, reflejan la falta de conocimiento sobre los requerimientos nutricionales de los machos durante el proceso reproductivo. Los trabajos en los cuales se logró mantener la calidad reproductiva de los machos de *L. setiferus* a partir de bajas temperaturas, coinciden con el suministro de alimento fresco, incluyendo gusanos (*Pontodrilus* sp y *Americanapus* sp) (Bray *et al.*, 1985; Pascual *et al.*, 1998). Es posible que una fuente de ácidos grasos halla afectado positivamente el desarrollo gonadal, considerando la participación de los lípidos como proveedores de energía y de nutrientes esenciales como esteroides y fosfolípidos. Sin embargo, las investigaciones desarrolladas hasta ahora en este sentido no han logrado detener el deterioro de la calidad reproductiva de los machos mantenidos en cautiverio a través de los componentes incluidos a la dieta (Alfaro, 1990).

Los machos de *L. setiferus* durante el experimento fueron alimentados a partir de calamar y de dieta peletizada especial para maduración (Microfeast 608). La composición químico proximal del calamar en base seca, indica que la porción lipídica tan sólo constituye el 5.5%, mientras que las proteínas representan el 71% y los carbohidratos el 11%, por su parte el alimento peletizado especial para maduración, es rico en lípidos (14.6%), pero lamentablemente no fue bien aceptado por los machos en el presente estudio, sólo el 3.6% del alimento consumido lo constituyó la dieta comercial. A lo largo del bioensayo se observó una pérdida de peso en los machos de *L. setiferus* y un disminución

significativa en todos los metabolitos evaluados en la hemolinfa (Anexo 7), por lo cual consideramos que el alimento suministrado no logró abastecer la demanda energética de los organismos mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C. Para lograr manejar la maduración y la reproducción en cautiverio es indispensable conocer el requerimiento de proteínas, lípidos y carbohidratos de los reproductores, tomando en cuenta que éste sea con mucha probabilidad especie y sexo específico.

El colesterol como precursor de hormonas esteroideas, es uno de los elementos necesarios durante la maduración gonádica, y su requerimiento en el caso de los crustáceos es cubierto por vía dietética (Teshima *et al.*, 1997). En los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio a 33 °C, se observó una relación entre la concentración de colesterol y la calidad reproductiva. Los niveles de colesterol a partir del día tres disminuyeron en un 52.6% ($P < 0.05$), mientras que el porcentaje de espermatozoides normales disminuyó en un 65% a partir del mismo día ($P < 0.05$). A lo largo del experimento los niveles de colesterol en la hemolinfa no lograron restablecerse (Anexo 7), como tampoco el porcentaje de espermatozoides normales (Anexo 6). La similitud en el comportamiento del colesterol y de la calidad reproductiva durante el experimento, pone de manifiesto la implicación del uso de los nutrientes en los procesos reproductivos.

La dramática disminución en la producción de espermatozoides y el alto porcentaje de espermatozoides anormales observados en los machos de *L. setiferus* a partir del día tres del experimento, concuerda con la descripción del síndrome de degeneración del aparato reproductor de los machos adultos (SDARM) (Chamberlain *et al.*, 1983, Talbot *et al.*, 1989). Aunque la causa de este síndrome permanece incierta, ha sido relacionada a cuestiones endócrinas y parece particularmente sensible al estrés causado por el cautiverio (Alfaro, 1990). La disminución de la calidad espermática ha sido asociada a la parcial o total desaparición de las secreciones glandulares en el ápula, las cuales se consideran responsables del mantenimiento de los espermatozoides (Talbot *et al.*, 1989). En organismos expuestos a temperaturas mayores a 27 °C es posible que los mecanismos relacionados con la función de estas glándulas se vean afectados (Pascual *et al.*, 1998). Esta idea concuerda con la aparición de espermatozoides muertos desde el día cinco hasta el final del bioensayo en los machos mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C (Anexo 6).

De acuerdo con Alfaro (1993), el proceso de maduración en los machos peneidos se desarrolla en tres niveles independientes. El primero es la maduración testicular la cual produce espermatozoides inmaduros. El segundo nivel actúa en el vaso deferente, donde se terminan de madurar los

espermatozoides al ser polimerizada la cola y donde se realizan las secreciones que conforman las paredes acelulares del espermátforo. En el tercer nivel se realiza la síntesis del espermátforo dentro del ámpula terminal, en donde es empaquetado el producto final.

En los machos mantenidos en cautiverio fueron observadas células anormales de doble cabeza o malformaciones en la cola, lo cual podría indicar alteraciones en los mecanismos reguladores del proceso de maduración a nivel del vaso deferente, posiblemente en la glándula androgénica. La apariencia deteriorada del espermátforo de los organismos muestreados el día siete del experimento, revela alteraciones macroscópicas en la última sección de la gónada. En los espermátforos extraídos se encontraron estructuras de anclaje poco definidas o debilitadas y el material aglutinante con cambios en la textura perdiendo adhesividad, revelando alteraciones a nivel del ámpula terminal.

El deterioro macroscópico del espermátforo esta asociado a diferentes condiciones en donde sobresalen el tiempo de cautiverio, temperaturas mayores a 27 °C , la inoculación de bacterias en el gonoporo o en el agua de cultivo y la obtención de espermátforos manualmente o por electroestimulación (Chamberlain *et al.*, 1983; Sandifer *et al.*, 1984; Rosas *et al.*, 1993). En algunos casos las alteraciones visibles en el espermátforo son generadas por un cuadro infeccioso, el cual es caracterizado por el oscurecimiento de las estructuras reproductivas y es definido como síndrome de melanización del aparato reproductor (SMAR). La melanina esta presente debido a la activación del sistema profenoloxidasas por moléculas microbianas (Alfaro, 1993). En el presente estudio, sólo fue detectado un organismo con inicio de melanización (Estado 2) en el día diez del bioensayo, lo cual concuerda con el proceso de melanización registrado en los organismos expuestos a 30 °C (Pascual *et al.*, 1998).

La marcada disminución en la calidad reproductiva de los machos mantenidos en cautiverio, señala posibles alteraciones en los mecanismos reguladores del proceso de maduración. Parece ser que el tiempo de cautiverio y la temperatura alta (33 °C) actúan sobre el sistema endócrino del organismo. Como consecuencia uno de los eventos que pudo ser alterado es el ciclo de la muda, el cual es clásicamente regulado por hormonas (ecdisteroides). La hormona inhibidora de la muda (HIM) es un neurotransmisor que se origina en el complejo neuroendócrino, glándula sinusal-organo X, localizada en el tallo del pedúnculo ocular. La HIM inhibe la esteroidogénesis a través de receptores específicos de alta afinidad en la membrana de las células del organo-Y, en donde se produce la hormona promotora de la muda (HPM) (Sefiani *et al.*, 1996; Palacios, 1999). La glándula sinusal participa en otras

importantes funciones metabólicas, como la producción de la hormona inhibitoria de la gónada (HIG). Las alteraciones fisiológicas normalmente asociadas al proceso de muda fueron observadas en los machos de *L. setiferus* recientemente capturados (Tabla 2) pero no en los organismos mantenidos en cautiverio. Quizá las respuestas metabólicas desplegadas a partir de las condiciones de cautiverio a 33 °C afectaron a nivel de la actividad enzimática generando suficientes alteraciones sobre los componentes de la hemolinfa como para no distinguir los cambios generados por el proceso de muda (Tabla 7) o tal vez afectó directamente los mecanismos reguladores del proceso de la muda.

La liberación de aminas biogénicas fue la respuesta bioquímica inicial ante condiciones de estrés en *C. maenas* (Lüschen *et al.*, 1993), estas moléculas han sido postuladas como moduladores de la liberación de varias neurohormonas del tejido neuroendocrino de los crustáceos. Por ejemplo, la serotonina (5-HT) estimula la liberación de la hormona hiperglicemiante de los crustáceos (HHC), la cual se origina en la glándula sinusal y estimula la glucogenólisis a nivel del músculo y en el hepatopáncreas e inhibe la síntesis de glucógeno (Lüschen *et al.*, 1993). Adicionalmente la 5-HT ha sido propuesta como modulador del desarrollo de los ovarios de varios crustáceos al estimular la liberación de la hormona promotora de la gónada (HPG) (Fingerman *et al.*, 1994). El carácter multimoderador de las aminas biogénicas revelan la profunda asociación entre los procesos involucrados en abastecer el requerimiento energético y los procesos reproductivos.

En los crustáceos, la síntesis y la liberación de hormonas reproductivas está en función de factores exógenos como la temperatura y de factores endógenos como el estado de desarrollo, el estado de muda y las reservas energéticas necesarias para suplir el costo de la maduración gonadal. En el medio natural el ciclo reproductivo se encuentra sincronizado con la calidad y disponibilidad del alimento (Castille y Lawrence, 1989). En este sentido las alteraciones de los metabolitos y de la calidad reproductiva en los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio, concuerdan con la integración funcional de la respuesta fisiológica ante una condición de estrés.

El papel adaptativo de la hormona hiperglicemiante ha sido referido con base en diversos estudios en donde se registran altos niveles de glucosa bajo condiciones de estrés (Webster, 1996). Al parecer la concentración de lactato promueve la liberación de la HHC mientras que los niveles de azúcar en sangre la inhibe (Santos y Keller, 1993). El alto nivel en la hemolinfa de lactato el día siete pudo haber estimulado la actividad de la HHC y la recuperación de los niveles de glucosa observados el día ocho podrían sumarse a esta hipótesis

El complejo mecanismo de control que opera en la homeostasis de carbohidratos, se ve reflejado en la posible doble función de un péptido, como HHC y como HIM. En términos fisiológicos, la existencia de un simple péptido que regule la muda y los niveles de glucosa en hemolinfa puede estar relacionado con la clásica multifuncionalidad de muchas hormonas (Sefiani *et al.*, 1996). Bajo esta perspectiva resulta congruente encontrar consistencia entre las alteraciones en los sustratos energéticos de la hemolinfa y en la calidad reproductiva en los machos de *L. scitiferus* mantenidos en cautiverio.

El estado fisiológico de los organismos determina no solo su desempeño reproductivo, sino su capacidad de crecimiento y la susceptibilidad que presentan ante las enfermedades. Un estudio realizado con *P. monodon* revela que bajo condiciones estresantes la concentración de magnesio (Mg) actúa como indicador de estrés. El Mg al igual que otros iones es regulado activamente y los cambios en los niveles de la hemolinfa pueden generarse por daños en las branquias o por disfunciones osmoreguladoras causadas por el estrés (Hall y van Ham, 1998). Las correlaciones encontradas entre la capacidad osmótica y los componentes de la hemolinfa de los organismos recién capturados se pierden en los organismos mantenidos en cautiverio a 33 °C reflejando una posible alteración en los procesos osmoreguladores (Tabla 10).

Desde hace tiempo ha sido estipulada la correlación entre el nivel de Mg en hemolinfa y la actividad general en los decápodos (Tentori y Lockwood, 1990). En un estudio realizado con *Macrobrachium amazonicum* se observó que la temperatura afecta la concentración de Mg en la hemolinfa (Zanders y Rodríguez, 1992). Las fluctuaciones de este ion tienen a su vez implicaciones sobre el sistema de defensa, pues en algunos camarones la actividad de fenoloxidasa aumenta por los iones divalentes de Ca y de Mg, y es fuertemente inhibida por las altas concentraciones de estos mismos iones (Perazzolo y Barraco, 1997). En los machos mantenidos en cautiverio, el patrón de comportamiento de la actividad de fenoloxidasa en plasma y la actividad de fenoloxidasa total en el degranulado de hemocitos (FO+proFO) podrían obedecer a controles metabólicos compensatorios (Figura 6). Debido a que la actividad de proFO en plasma coincide con el patrón de comportamiento de los niveles de proFO total en los hemocitos, quizá los procesos de síntesis de los componentes de sistema fenoloxidasa y su liberación se encuentran íntimamente asociados.

La comunicación inmuno-neuronal ha quedado establecida en moluscos (*Aplasia californica*), donde la actividad de los hemocitos fue influenciada por sustancias endógenas, lo cual concuerda con sus

factores neuroactivos (Clatworthy, 1996). Las células con vesículas o gránulos deben de responder a las moléculas específicas que generan una exocitosis regulada, como sucede en las células granulares de los camarones, en donde están compartimentalizados los componentes del sistema profenoloxidasa (Johansson y Söderhäll, 1989). Bajo condiciones de estrés se ha observado que la actividad de fenoloxidasa aumenta independientemente a la disminución en el número de hemocitos, lo cual ha sido explicado a partir del ajuste de los reguladores plasmáticos del sistema, como son la α_2 -macroglobulina y el inhibidor de tripsina. La α_2 -macroglobulina puede atrapar a la serin proteasa, sin desactivarla como lo hace el inhibidor de tripsina, la serin proteasa es la enzima encargada de activar la profenoloxidasa en fenoloxidasa, ésta peculiaridad del mecanismo regulador de la α_2 -macroglobulina explica los resultados obtenidos donde la mayor actividad de la α_2 -macroglobulina coincide con niveles mayores de actividad de fenoloxidasa en camarones mantenidos bajo condiciones de hipoxia (Le Moullac *et al.*, 1998). El ajuste en los mecanismos reguladores del sistema bajo condición de hipoxia concuerda con la hipótesis generada en el presente trabajo acerca de la regulación metabólica sobre el sistema profenoloxidasa en machos mantenidos en cautiverio a 33 °C.

En los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días, la cantidad de células semigranulares y la actividad de proFO (FO+proFO/TH) presentaron correlación significativa. La actividad de proFO por su parte mostró asociaciones con los triacilglicéridos, con el colesterol y con las células hialinas (CH) (Tabla 10). Estas correlaciones no fueron encontradas en los organismos recién capturados. Es posible que la interacción entre la actividad de proFO y los componentes lipídicos se base en la capacidad de los ácidos grasos y fosfolípidos de activar el sistema fenoloxidasa (Nellaiappan y Sugumaran, 1996). La activación mediada por lípidos representa una ventaja en circunstancias de daño tisular, mientras que la asociación encontrada con las CH quizá obedece a la participación de los componentes del sistema fenoloxidasa en la respuesta inmune, como la producción de factores opsonicos y su intervención en la comunicación celular para algunos mecanismos multiméricos de defensa (Smith y Soderhäll, 1986; Soderhäll *et al.*, 1986; Soderhäll, 1992).

Durante el proceso de aclimatación es posible que las señales neuronales que responden a las condiciones del laboratorio generen la activación de mecanismos de compensación a nivel del metabolismo en general incluyendo el sistema endócrino y el sistema inmune de los machos de *L. setiferus*. Esta idea concuerda con los ajustes de los reguladores del sistema fenoloxidasa observados en *F. stylirostris* bajo condición de hipoxia (Le Moullac *et al.*, 1998), o los cambios en la respuesta

celular observada en los organismos expuestos a cambios drásticos de salinidad y de temperatura (Fisher y Roger, 1986; Fisher *et al.*, 1987; Fisher y Tamplin, 1988). El síndrome de melanización del tracto reproductivo de los machos puede ser generado en parte, por una mayor susceptibilidad hacia las infecciones, la cual podría ser explicada a partir de los ajustes en el sistema de defensa y/o por una condición nutricional inadecuada.

De acuerdo a las observaciones a nivel de microscopía electrónica realizadas por Dougherty *et al.* (1987), en los espermatóforos melanizados de *L. vannamei* se han observado gotas de melanina en los gránulos intranucleares de los espermatozoides degenerados (sin cola) y en los de apariencia normal. A partir de las observaciones en los componentes del espermatóforo los autores proponen la siguiente secuencia de eventos: acumulación de melanina por espermatozoides normales, depolimerización de la cola de los espermatozoides con presencia de melanina intranuclear y finalmente la degeneración de las células espermáticas.

Recientemente se ha observado en los machos de *L. setiferus* expuestos a 27 °C y 31°C un aumento en la actividad de fenoloxidasas asociado al proceso de aclimatación (Sánchez, 2000), el cual fue relacionado con las alteraciones observadas en el sistema de profenoloxidasas bajo condiciones de estrés (Le Moullac *et al.*, 1998; Vargas-Albores *et al.*, 1998). Tal alteración pudiera estar relacionada con la acumulación intranuclear de melanina de las células espermáticas afectando la calidad espermática. El aumento de la actividad de proFO en organismos estresados concuerda con la sintomatología del síndrome de melanización, el cual ha sido observado sobre todo en machos expuestos a condiciones de estrés, como la electroestimulación o temperaturas mayores a 30 °C, en los cuales el porcentaje de espermatozoides anormales aumenta drásticamente.

En la presente investigación la calidad reproductiva disminuyó principalmente por la presencia de espermatozoides anormales y muertos. Con respecto al SMAR solo fue encontrado un macho en estado inicial de melanización en el día 10. Al mismo tiempo se obtuvieron evidencias de que el espermatóforo pudiera estar degenerándose a partir del día 7 pues se observó que algunas de las estructuras del espermatóforo (alas y el material aglutinante) estaban mal definidas ó habían perdido su funcionalidad y consistencia. Estas alteraciones posiblemente obedezcan a la secuencia propuesta por Dougherty *et al.* (1987), en la que la degeneración y la melanización pudieran ser diferentes etapas de un mismo fenómeno. Desafortunadamente las apreciaciones a nivel macro y microscópicas efectuadas en esta investigación no pueden confirmar la presencia de melanina en la masa espermática ni en los

espermatozoides. Futuras investigaciones deberían encaminarse en este sentido, con el fin de dilucidar los mecanismos fisiológicos e inmunes involucrados en la secuencia de eventos que ocurren a nivel de las células germinales y que se expresan a través de los síndromes del aparato reproductor de los machos de camarones peneidos.

Por otro lado, en los camarones mantenidos en cautiverio a 33 °C la concentración de hemocitos presentó una marcada disminución a partir del día cuatro, la cual coincide con la disminución de los metabolitos (Anexo 7) y en particular con la concentración de glucosa, obedeciendo posiblemente a la participación de las células sanguíneas en el almacenamiento de carbohidratos y como fuente de glucosa en hemolinfa (Jonhston y Spencer, 1972; Santos y Keller, 1993). A su vez, la relación entre las células sanguíneas y los ácidos grasos en los camarones ha sido propuesta durante el proceso de reabsorción de nutrientes a nivel de los ovarios para ser transportados vía hemocitos al hepatopáncreas (Lee y Walker, 1995). Al igual que en los organismos recién capturados la interacción entre las células granulares y la actividad de fenoloxidasa fue observada en los machos mantenidos en cautiverio (Figura 6). El día seis las células granulares de la hemolinfa presentaron una disminución del 46%, mientras que la actividad de fenoloxidasa alcanzó su valor más bajo en ese día (Figura 5). Estos resultados coinciden con la disminución en la actividad de fenoloxidasa observada en *L. vannamei* mantenido a 32 °C (Vargas-Albores *et al.*, 1998). Por esta razón el comportamiento de los hemocitos en el presente estudio reveló la importancia fisiológica e inmune que estos desempeñan, así como su posible utilización como indicador del estado fisiológico de los camarones.

El deterioro ambiental y las condiciones de cultivo están relacionados con la aparición de cuadros infecciosos (Bachere *et al.*, 1995), ya que el deterioro de la calidad de agua puede generar estrés fisiológico, lo cual hace a los camarones más receptivos a los patógenos (Hall y van Ham, 1998). El brote y la diseminación de padecimientos infecciosos representan uno de los mayores problemas que actualmente enfrenta la industria camaronícola. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de los parámetros ambientales del cultivo y en la identificación de los organismos que los afectan, se carece de un método de diagnóstico que permita determinar el estado fisiológico de los camarones para establecer su grado de susceptibilidad al contagio.

En la presente investigación las evaluaciones inmunes y bioquímico-fisiológicas resultaron consistentes con la calidad reproductiva, tanto en los machos recién capturados como en organismos mantenidos en cautiverio a 33 °C, reflejando su posible utilización como herramientas de diagnóstico. Las técnicas

empleadas para evaluar los componentes de la hemolinfa, el conteo y caracterización de los hemocitos, así como la calidad reproductiva resultan relativamente sencillas y baratas, además pueden llevarse a cabo sin sacrificar a los organismos, posibilitando su uso en programas de monitoreo en las granjas camaronícolas.

El objetivo final de muchas investigaciones está relacionado con la domesticación de especies importantes de camarón y la obtención de cepas específicas seleccionadas por caracteres de importancia económica, como la adaptabilidad a condiciones extremas de cultivo y la resistencia a patógenos comunes. El establecimiento de poblaciones cautivas podría permitir el mejoramiento genético de los camarones y lograr los beneficios obtenidos en otros grupos de organismos. Por eso resulta indispensable cerrar el ciclo biológico de *L. setiferus*, el cual, acoplado a programas preventivos que permitan monitorear el estado fisiológico-inmunológico de los camarones en cultivo serían la base para contar con poblaciones sanas, con las cuales se podría obtener una mayor capacidad biológica de la especie, aumentar la rentabilidad de la actividad productiva y disminuir los riesgos patológicos comúnmente presentes en esta industria.



Conclusiones

- La calidad reproductiva de los machos adultos recién capturados de *Luopenaeus setiferus* y el estado inmune, no presentaron diferencias significativas entre las cuatro capturas realizadas de septiembre a noviembre de 1998.
- La concentración de glucosa en la hemolinfa de los machos de *L. setiferus* provenientes de diferentes capturas no presentó diferencia significativa (0.21 mg/mL), mientras que las concentraciones de proteínas, colesterol, triacilglicéridos y calcio, fluctuaron entre los meses, obedeciendo posiblemente a las variaciones en la historia alimenticia de la población.
- Los machos adultos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C, presentaron importantes alteraciones en los componentes de la hemolinfa y una significativa disminución de la calidad reproductiva relacionada con las fases iniciales del síndrome de melanización del tracto reproductivo de los machos.
- El peso de los organismos disminuyó significativamente aunque el consumo de alimento se vio incrementado ($P < 0.05$). Revelando que el alimento suministrado (calamar y peletizado comercial para maduración) no logró abastecer la demanda energética de los organismos mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C.
- Las evaluaciones bioquímicas en la hemolinfa de los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio mostraron una importante disminución de los metabolitos y del calcio a partir del tercer día del experimento, las concentraciones en la hemolinfa de colesterol y de calcio no lograron ser compensadas a lo largo del bioensayo. Por su parte los niveles de glucosa, proteínas y triacilglicéridos fueron restablecidas en un 70% para el día diez, revelando la actividad de mecanismos compensatorios.
- Los hemocitos de los machos mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C presentaron una disminución significativa para el día seis del experimento mientras que la actividad de profenoloxidasa reveló un patrón de comportamiento en donde no se observaron diferencias significativas con el valor inicial ni tampoco entre los días del experimento.
- La concentración de triacilglicéridos y de colesterol en los organismos recién capturados y en los mantenidos en cautiverio a 33 °C estuvo relacionada a la condición reproductiva de los machos adultos de *L. setiferus*, revelando su posible uso como indicador del estado reproductivo.
- Estos resultados demuestran que en organismos recién capturados y bajo condiciones de cautiverio las variaciones de los metabolitos son consistentes con las variaciones de la respuesta inmune y con la calidad reproductiva de los machos de *L. setiferus*, lo cual refleja su posible utilización como herramientas de diagnóstico para determinar el estado fisiológico de los camarones.

Literatura Citada

- Adiyodi, G.R. (1985). *Reproduction and its control: In the biology of crustacea: Integumentes, pigments and hormonal processes*. Academic Press.
- Alfaro, J. (1990). *A contribution to the understanding and control of the male reproductive system melanization disease of broodstock Penaeus setiferus*. Master, Texas A & University.
- Alfaro, J. (1993). Reproductive quality evaluation of male *Penaeus stylirostris* from grow-out pond. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24: 6-11.
- Alfaro, J. (1994). Ultraestructura de la glándula androgénica, espermatogénesis y oogénesis de camarones marinos (Decapoda: Penaeidae). *Rev. Bipol. Trop.*, 42: 121-129.
- Angus, F. (1989). Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve, and crustacean larvae. *Cam. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 1868-1872.
- Aono, H., Gómez-Díaz, G. y Mori, K. (1994). Granular cells recognize non-self signals and trigger the clotting reaction of hemocytes in vitro in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107A: 37-42.
- Aono, H. y Mori, K. (1996). Interaction between hemocytes and plasma is necessary for hemolymph coagulation in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113 A: 301-305.
- Aquacop, Richard, J., Soyes, C., Lemaire, P., Rey, P., Langy, S., Capuato, T., Thuet, P., Trilles, J. y Charmantier, G. (1992). *Un nuevo taller diagnóstico: la capacidad osmótica osmo-reguladora como indicador de estrés en el camarón*. Paper presented at the Congreso Ecuatoriano de Acuicultura, ESPL, Ecuador.
- Ashida, M. y Söderhäll, K. (1984). The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B: 21-26.
- Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A. y Rodriguez, J. (1995). Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture*, 132: 17-32.
- Bolongaro-Crevenna, A.R. (1997). *Ecofisiología de seis macrocrustáceos dominantes (Decapoda) de la plataforma continental del NW del Golfo de México*. Tesis Maestría, UNAM.
- Bradford, M.M. (1976). A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248.
- Bray, W.A. y Lawrence, A.L. (1992). *Reproduction of penaeus species in captivity*. Elsevier Science Pub.

- Bray, W.A., Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L. y Robertson, S.M. (1985). Preliminary investigation of the effects of the temperature, bacterial inoculation and EDTA on the sperm quality in captive *Penaeus setiferus*. *J. World Maric.*, 160: 250-257.
- Browdy, C. (1992). A review of the reproductive biology of penaeus species: perspectives on controlled shrimp maturation system for high quality nauplii production. In J. Wyban (Ed.), *Proceeding of the special session on shrimp farming*. LA, USA: World Aquaculture Society.
- Brown, A.J., Macvey, J., Middleditch, B.S. y Lawrence, A.L. (1979). Maturation of white shrimp (*Penaeus setiferus*) in captivity. *World Maricul. Soc.*, 10.
- Castille, F. y Lawrence, A. (1989). Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus* (L.). *J. Crustac. Biol.*, 9: 202-211.
- Clark, W.H.J., Maurice, G., Klene, M.G. y Yudin, A.I. (1981). An acrosoma reaction in natatian sperm. *Exp. Zool.*, 218: 279-291.
- Clatworthy, A. (1996). A simple system approach to neural-immune communication. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A: 1-10.
- Claybrook, D. (1983). Nitrogen metabolism. In D.E. Bilss (Ed.), *The biology of crustacea* (pp. 163-213). Orlando, Florida: Academic Press.
- Chamberlain, G., Jonhson, S. y Lewis, D. (1983). Swelling and melanization of the male reproductive system of captive adult peneid shimp. *J. World Maricul.*, 14: 135-136.
- Chan, S.-M., Rankin, S.M. y Keeley, L.L. (1988b). 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., Soyes, C. y Aquacop (1994). Effect of moult stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the peneid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Ecol.*, 178: 223-246.
- Chow, S., Dougherty, M.M., Dougherty, W.Y. y Sandifer, P.A. (1991). Spermatophore formation in the white shrimp *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*. *J. Crust. Biol.*, 11: 201-216.
- Dall, W. y Smith, D.M. (1986). Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture*, 55: 23-33.
- Dougherty, W., Dougherty, M. y Harris, S. (1987). *Electron microscopic observations on the melanized spermatophores of the penaeid shrimp, Penaeus vannamei*. Medical University of South Carolina.

- Dougherty, W.J. y Dougherty, M.M. (1989). Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of the pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Inv. Path.*, 54: 331-343.
- Dubois, M.K., Lilles, L.A., Hamilton, J.C., Rebers, P.A. y Smith, F. (1965). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.*, 28: 350-356.
- Fajer, M. (1992). *Caracterización del estado reproductivo de una población de machos de Penaeus setiferus y el tiempo de regeneración del espermátforo en organismos mantenidos en cautiverio*. Tesis, UNAM.
- Ferraris, J.D., Fauchald, K. y Kensley, B. (1994). Physiological responses to fluctuation in temperature or salinity in invertebrates. Adaptations of *Alpheus viridari* (Decapoda, Crustacea), *Terebellides parva* (Polychaeta) and *Golfingia cylindrata* (Sipunculida) to the mangrove habitat. *Marine biology. Berlin, Heidelberg*, 120: 397-406.
- Fingerman, M., Nagabhushanam, R. y Sarojini, R. (1994). Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *J. Crus. Biol.*, 14: 413-437.
- Fisher, W., Aufret, M. y Balouet, G. (1987). Responce of the flat oyster (*Ostrea edulis*) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture*, 67: 179-190.
- Fisher, W. y Roger, N. (1986). Salinity effects on the activity of the granular hemocytes of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.*, 170: 122-134.
- Fisher, W. y Tamplin, M. (1988). Enviromental influence on activities and foreing-particle binding by hemocytes of american oyster, *Crassostrea virginaca*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 1309-1315.
- Fontaine, C.T. y Lightner, D.V. (1974). Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particules injected into the abdominal musculature of the white shrimp *Penaeus setiferus*. *J. Inver. Phatol.*, 24: 141-148.
- Fry, F.J. (1947). Effects of the environment on animal activity. *University of Toronto Studies, Biological Series No. 55*, 68: 1-60.
- Gleecross, B. y Smith, D. (1997). Comparasion of triacilglycerols, esterified and free fatty acids as neutral lipid sources in the diet of the praw *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 159: 67-83.
- Guitar, B. y Quintana, M.A. (1978). Estadios de maduración gonadal en las especies comerciales importantes del género *Penaeus* en el Banco de Campeche. *Rev. Cub. Inv. Pesq.*, 3: 82-126.
- Guzmán-Murillo, A., Ochoa, J.L. y Vargas-Albores, F. (1993) The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A: 271-275.

- Hall, M.R. y van Ham, E.H. (1998). The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29: 290-299.
- Harris, J., Sheahan, D., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, R., Rycroft, R., Sumpter, J. y Tylor, T. (1996). A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland water. *Environ. Toxic. Chem.*, 15: 1993-2002.
- Harris, S.E.G. y Sandifer, P.A. (1986). Sperm production and effects of the electrically induced spermatophore expulsion in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *J. Crust. Biol.*, 6: 633-667.
- Hauton, C., Hawkins, L. y Williams, J. (1997). *In situ* variability in phenoloxidase activity in shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B: 267-271.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. y Vargas-Albores, F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113C: 61-66.
- Hernández-López, J. y Vargas-Albores, F. (1996). *Implementación de un método en microplaca para la determinación de glucosa, colesterol, acilglicéridos, lactato y proteínas totales de la hemolinfa de camarón*. CIB-NOR.
- Johansson, M.W. y Söderhäll, K. (1985). Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol.*, 156B: 175-181.
- Johansson, M.W. y Söderhäll, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol. Today*, 5: 171-176.
- Jonhston, M. y Spencer, D. (1972). Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissue of *Carsinus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 41B: 433-443.
- King, J.E. (1948). A study of the reproductive organs of the common marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767). *Biol. Bull.*, 94: 244-262.
- Krol, R.M., Hawkins, W.E. y Overstreet, R.M. (1992). *Reproductive components*. In: *Microscopy anatomy of invertebrates*. (Vol. 10: Decapod Crustacea). (Wiley-Lyss. Inc. ed.).
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M.L., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. y Aquacop. (1997). Hematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 7: 227-234.
- Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J. y Levy, P. (1998). Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 8.

- Le Moullac, G., van Wormhoudt, A. y Aquacop (1994). Adaptation of digestive enzyme to dietary protein, carbohydrate and fiber levels, and influence of protein carbohydrate quality in *Penaeus vannamei* larvae (Crustacea, Decapoda). *Aquatic Living Resources*, 7: 203-210.
- Lee, R. y Walker, A. (1995). Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Experim. Zool.*, 274: 401-412.
- Leonard, C., Söderhäll, K. y Ratcliffe, N.A. (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus crannifer* haemocytes. *Insect. Biochem.*, 15: 803-810.
- Leung-Trujillo, J.R. y Lawrence, A.L. (1987). Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture*, 65: 363-370.
- Leung-Trujillo, J.R. y Lawrence, A.L. (1991). Spermatophore generation times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei* and *P. stylirostris*. *J. World Aquaculture Soc.*, 22: 244--251.
- Lewis, D.H. y Lawrence, A.L. (1983). Immunoprophylaxis to *Vibrio* sp. in pond reared shrimp. *1st. Int. Conf. Warwat. Aquacult. Crust.*: 304-307.
- Lignot, J.H., Cochard, J.C., Soyeux, C., Lemaire, P. y G., C. (1999). Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 170: 79-92.
- Lüschen, W., Willing, A. y Jaros, P. (1993). The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carsinus maenas* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105C: 291-296.
- Martin, G., Hose, J., Omori, S., Chong, C., Hoodbhoy, T. y McKrell, N. (1991). Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation on decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100 B: 517-522.
- Muncy, R.J. (1984). *Species profiles life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Atlantic)* (Vol. 19).
- Murray, H. y Beck, J. (1990). Concentrations of selected chlorinated pesticides in shrimp collected from the calcasieu river/lake complex, Louisiana. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 798-804.
- Nellaiappan, K. y Sugumaran, M. (1996). On the presence of the prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B: 163-168.
- Palacios, E., Ibarra, M.E., Ramírez, J.L., Portillo, G. y Racotta, E. (1998). Biochemical composition of egg and nauplii in white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) in relation to physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquaculture Research*, 29: 183-189.

- Palacios, E., Pérez-Rostro, C.I., Ramírez, J.L., Ibarra, A.M. y Racotta, I.S. (1999). Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture*, 171: 309-321.
- Palacios, E.M. (1999). *Caracterización fisiológica del agotamiento reproductivo y optimización de la reproducción del camarón blanco del Pacífico Penaeus vannamei (Boone, 1931) (Decapoda: Penaeidae)*. Tesis Doctorado, CIB, México.
- Pascual, C., Valera, E., Re-regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L.A. y Rosas, C. (1998). Effect of temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *World Aquaculture Society*, 29: 477-484.
- Paterson, B.D. (1993). The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeids prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B: 395-400.
- Perazzolo, L. y Barraco, M. (1997). The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. *Dev. Comp. Immunol.*, 21: 385-395.
- Pérez, L. y Ramos, L. (1992). Determinación de la proporción de machos del camarón blanco *Penaeus schmitti* en tanques de maduración inducida para el incremento de la cópula natural. *Rev. Inv. Mar.*, 13: 137-176.
- Ponce, V.G. y Botello, A.V. (1991). Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Terminos, Campeche. *Hidrobiología*, 1: 1-10.
- Pratomchat, B., Piyatiratitivorakul, S. y Menasveta, P. (1993). Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. *J. World Aquac. Soc.*, 24: 530-540.
- Primavera, J.H. (1985). *A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids*. Paper presented at the Proceedings of the First International Conference on the culture of Penaeid Prawn/Shrimp, Iloilo City, Philippines.
- Prosser, L.C. (1950). *Comparative animal physiology*. Philadelphia, USA.
- Racotta, I.S. y Palacios, E. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal World Aquaculture Society*, 29: 351-356.
- Radha, T. y Subramoniam, T. (1985). Origin and nature of spermatophoric mass of the spiny lobster *Panulirus homarus*. *Mar. Biol.*, 86: 13-19.
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J. y Lawrence, A.L. (1990). Structure and function of the vas deferents in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1-3. *Crust. Biol.*, 10: 455-468.

- Robertson, L., W.A., B., Samocha, T. y Lawrence, A.L. (1993) *Reproduction of penaeid shrimp*. (Vol. Handbook of mariculture:Crustacean aquaculture.) (CRC Press ed.). Boca Raton, Florida, USA.
- Rosales, M., Botello, V., Bravo, H. y Mendelli, E. (1979) PCBs and organochlorine insecticides in oysters from coastal lagoons of the Gulf of Mexico, Mexico *Environm. Contam. Toxicol.*, 21: 652-656.
- Rosas, C., Bolongaro-Crvenna, A., Sanchez, A., Gaxiola, G., Soto, L. y Escobar, E. (1995a). Role of the digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biol. Bull.*, 189: 168-174.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le Priol, Y., C. P., Rossignol, J., Contreras, F., Sánchez, A. y van Wormhoudt, A. (2000a). Effect of dietary carbohydrate levels and salinity on metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Mur. Biol. (en revisión)*.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G. y van Wormhoudt, A. (2000b). Effect of dietary protein and level energy (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* (Crustacea, Decapoda; Penaeidea). *Aquaculture (en prensa)*.
- Rosas, C., Sánchez, A., Chimal, M.E., Saldaña, G., Ramos, L. y Soto, L.A. (1993). The effect of electrical stimulation on spermatophore regeneration in white shrimp *Penaeus setiferus*. *Aquatic Living Resources*, 8: 139-144.
- Rosas, C., Sánchez, A., Díaz, E., Soto, L., Gaxiola, G., Brito, R., Baes, M.I. y Pedroza, R. (1995b). Oxygen consumption and ammonia excretion of *Penaeus setiferus*, *P. schmitti*, *P. duorarum* and *P. notialis* postlarvae fed purified test diets: effects of protein level on substrate metabolism. *Aquatic Living Resources*, 8: 161-169.
- Rosas, C., Sánchez, A., Escobar, E., Soto, L. y Bolongaro-Crevenna, A. (1992a). Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptations of crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A: 323-328.
- Rosas, C., Sánchez, A., Soto, L., Escobar, E. y Bolongaro-Crevanna, A. (1992b). Oxygen consumption and metabolic amplitude of decapod crustaceans from Northwest Continental Shelf of the Gulf of México. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A: 491-496.
- Sánchez, A. (2000). *Respuestas metabólicas, energética, bioquímica e inmunológica en machos adultos de Litopenaeus setiferus: aclimatación*. Tesis Maestría, UNAM.
- Sandifer, P.A., Hopkins, S.J., Stokes, A.D. y Browdy, C.L. (1993). Preliminary comparisons of the native *Penaeus setiferus* and pacific *P. vannamei* white shrimp for the pond culture in South Carolina, USA. *J. World Aquac. Soc.*, 24: 295-303.

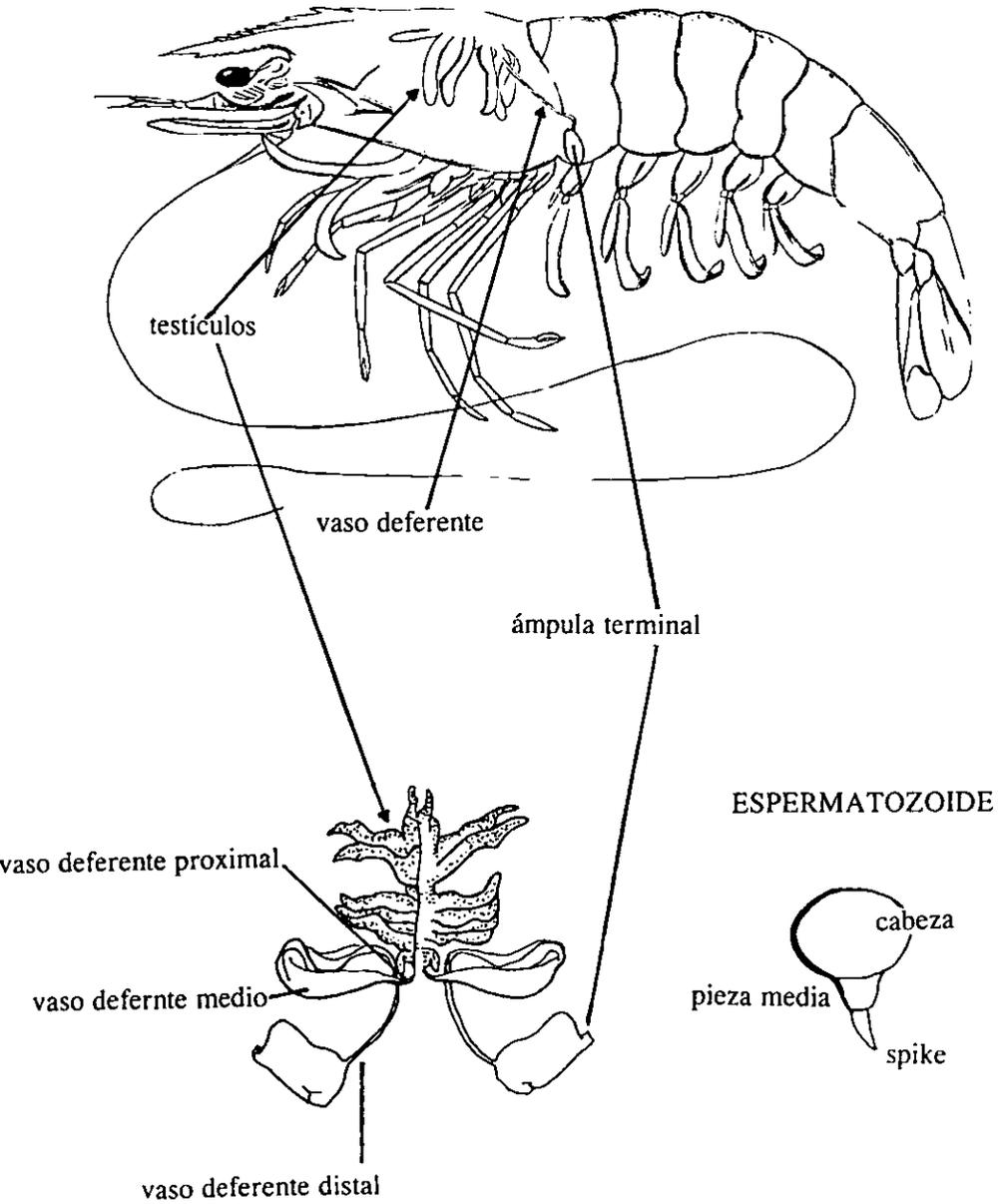
- Sandifer, P.A., Lawrence, A.L., Harris, S.G., Chamberlain, G.W., Stokes, A.D. y Bray, W.A. (1984). Electrical stimulation of spermatophore expulsion en marine shrimp, *Penaeus spp.* *Aquaculture*, 41: 181-187
- Santos, E. y Keller, R. (1993). Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A: 343-347.
- Sefiani, M., Le Carer, J. y Soyez, D. (1996). Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Gen. Com. Endoc.*, 103: 41-53.
- Sharpe, R. y Skakkebaek, N. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 341: 1392-95.
- Sima, P. y Vétvicka, V. (1990). *Evolution of the immune reactions*. Florida, USA: CRC Press.
- Smith, V. y Ratcliffe, N.A. (1978). Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), in vivo. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 58.
- Smith, V. y Ratcliffe, N.A. (1980). Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.): clearance and distribution of the injected test particles. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 60: 89-102.
- Smith, V.J. y Johnston, P.A. (1992). Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101C: 641-649.
- Smith, V.J. y Söderhäll, K. (1986). Cellular immune mechanism in the crustacea. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, 56: 59-79.
- Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods? A review *Develop. Comp. Immunol.*, 6: 601-611.
- Söderhäll, K. (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll. Zool.*, 59: 141-151.
- Söderhäll, K., Aspán, A. y Duvic, B. (1990). The proPO system and associated proteins -Role in cellular communication in arthropods. *Res. Immunol.*, 141: 896-907.
- Söderhäll, K., Rögner, W., Söderhäll, I., Newton, R.P. y Ratcliffe, N.A. (1988). The properties and purification of a *Blaberus crantifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β -1,3-glucan. *Insect Biochem.*, 18: 323-330.
- Söderhäll, K., Smith, V.J. y Johansson, M.W. (1986). Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.*, 245: 43-49

- Söderhäll, K., Vey, A. y Ramstedt, M. (1984). Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. *Develop. Comp. Immunol.*, 8: 23-29.
- Söderhäll, K., Wingren, A., Johansson, M.W. y Bertheussen, K. (1985). The cytotoxic reactions of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus*. *Cell. Immunol.*, 94: 326-332.
- Soto, A., Ching, L.K. y Sonnenschein, C. (1994). The pesticides Endoselfan, Toxaphene, and Dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health. Perspect.*, 102: 380-383.
- Spotts, D. y Lutz, P. (1981). L-lactic acid accumulation during activity. *J. Maricul. Soc.*, 12: 244-249.
- Talbot, P., Howard, D., Leung-Trujillo, J., Lee, T.W., Li, W.Y., Ro, H. y Lawrence, A.L. (1989). Characterization of the males reproductive tract degenerative syndrome in captive penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). *Aquaculture*, 78: 365-377.
- Tentori, E. y Lockwood, A. (1990). Haemolymph magnesium level in some oceanic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95A: 545-548.
- Teshima, S., Ishikawa, M., Koshio, S. y Kanasawa, A. (1997). Necessity of dietary cholesterol for the freshwater prawn. *Fisheries Science*, 63: 596-599.
- Van Wormhoudt, A. y Bellon-Humbert, C. (1996). Bases biológicas de los cultivos de los crustáceos. In G. Bernabé (Ed.), *Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura* (pp. 223-280). Zaragoza, España: Acribia.
- Vargas-Albores, F. (1995). The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.*, 3: 153-156.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.A. y Ochoa, J.L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A: 299-303.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Morillo, A. y Ochoa, J.L. (1991). Posibles indicadores de salud de los camarones y su aplicación en acuicultura. *Biotecnología*, 1: 17-25.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M.A. y Ochoa, J.-L. (1992). Size-dependent haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochem. Physiol.*, 103A: 487-491.
- Vargas-Albores, F., Hinojosa-Baltazar, P., Portillo-Clark, G. y Magallón-Barajas, F. (1998). Influence of temperature and salinity on the yellowleg shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system. *Aquaculture Research*, 29: 549-553.

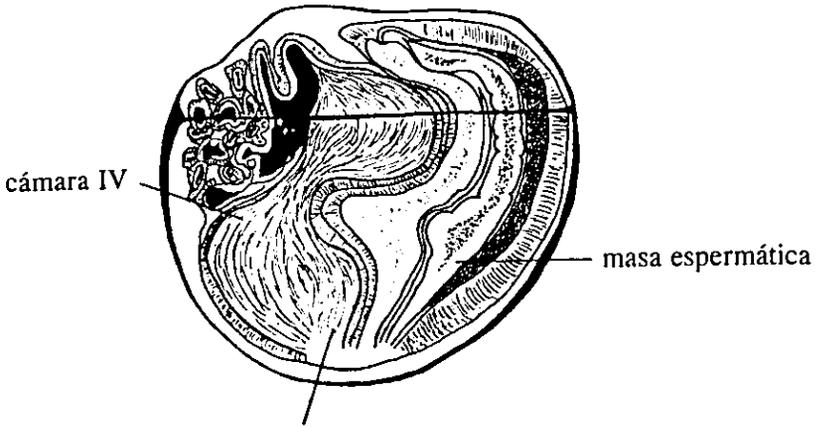
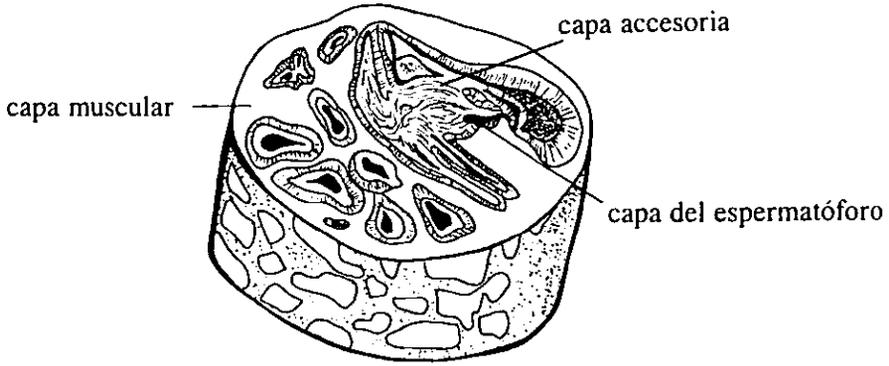
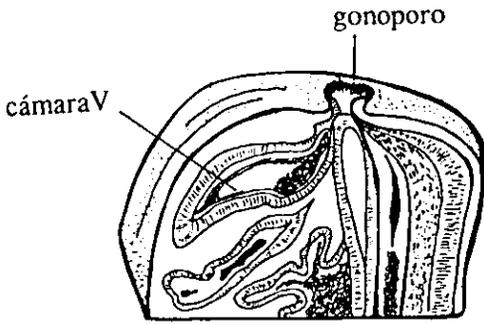
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. y Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 116B: 453-458.
- Vernberg, F.J. y Piyatirattivorakul, S. (1998). Effects of salinity and temperature on the bioenergetics of adult stages of the grass shrimp (*Paluemonetes pugio* Holthuis) from the North Inlet Estuary, South Carolina. *Estuaries*, 21: 176-193.
- Vernberg, J.L. (1983). Respiratory adaptations. In J.L. Vernberg y W. Vernberg (Eds.), *The biology of crustacean* (Vol. 8, pp. 147-215): Academic Press, Inc.
- Vinagre, A. y Da Silva, R. (1992). Effect of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A: 579-583.
- W.S.F. (1998). *World Shrimp Farming*.
- Webster, S.G. (1996). Measurement of crustacean hyerglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.*, 199: 1579-1585.
- Weidner, D., Revold, T., Wells, R. y Manual, A. (1992). *World shrimp culture*. (Vol. Latin America U.S. National Marine Fisheries Service.). Maryland: Silver Spring.
- Yano, I., Kanna, R.A., Oyama, R.N. y Wybay, J.A. (1988). Mating behavior in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.*, 97: 171-175.
- Zadehi, M., Denham, D.A. y Ham, P.J. (1992). Encapsulation and melanization responses of *Armigeres salbalbatus* against inoculated sephadex beads. *J. Inver. Pathol.*, 59: 258-263.
- Zanders, I. y Rodríguez, J. (1992). Effects of the temperature and salinity stress on osmoionic regulation in adults and on the oxygen consumption in larvae and adults of the *Macrobrachium amoazonicum* (Decapoda, Palemonidae). *Com. Biochem. Physiol.*, 101A: 505-509.
- Zar, J.H. (1974). *Biostatistical analysis*. New Jersey, USA.
- Zein-Eldin, Z.P., and Renaud, M.L. (1986). Inshore Environmental Effects on Brown Shrimp *Penaeus aztecus* and White Shrimp *P. setiferus* Populations in Coastal Waters, Particularly of Texas. *Marine Fisheries Review.*, 48: 9-19.
- Zubay, G. (1983). *Biochemistry*. USA: Addison-Wesley Publishing Company.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO 1. Esquematación del aparato reproductor de los machos de *P. setiferus*.



ANEXO 2. Esquematación del ámpula terminal de los machos de *P. setiferus*.



Anexo 3. Comparación de técnicas para el conteo de hemocitos

El conteo de hemocitos totales (HT) se evaluó por tres vías: manualmente con las cámaras de Neubauer y la de Malassez, posteriormente de manera automática a partir de un analizador de imágenes acoplado al microscopio utilizando a su vez la cámara de Malassez. Se compararon los conteos obtenidos para determinar el método más conveniente para analizar las variaciones de células en la hemolinfa de *L. setiferus*. En la siguiente figura podemos observar que ambos conteos realizados con la cámara de Malassez no presentan diferencia significativa y varían entre sí en el orden del 2%, mientras que los conteos efectuados con la cámara de Neubauer son significativamente menores ($P < 0.01$) a los obtenidos con Malassez.

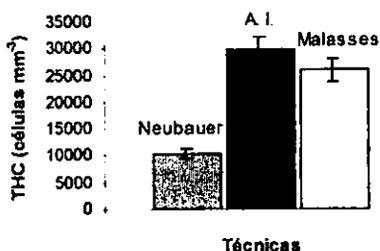


Figura A. Hemocitos totales \pm E.S de machos de *L. setiferus* realizado por tres métodos: manualmente utilizando las cámaras de Malassez y Neubauer y automáticamente por medio de un analizador de imágenes (A.I).

Posiblemente el volumen de muestreo de cada tipo de cámara: Malassez (0.01 mm^3) y Neubauer (0.1 mm^3) genera distintas unidades de muestreo derivando en diferencias significativas en los conteos aún al ser expresados ambos conteos en células/mm³.

Considerando lo anterior los resultados referidos a lo largo del documento como hemocitos totales (HT) son los obtenidos con el analizador de imágenes utilizando la cámara de Malassez. Los subtipos celulares fueron determinados manualmente utilizando solamente la cámara de Malassez.

Anexo 4. Tabla de resultados de los machos de *L. setiferus* recién capturados

| | No. | Promedio | Mínimo | Máximo | ES |
|--|-----|----------|---------|---------|--------|
| Peso (g) | 60 | 33.91 | 22.74 | 48.57 | 0.092 |
| Capacidad osmótica (mOsm/kg) | 60 | -70.90 | -200.00 | 59.00 | 0.903 |
| HT (células/mm ³) | 52 | 74786 | 31248 | 156596 | 568.7 |
| CG (células/mm ³) | 51 | 5718 | 1600 | 10400 | 38.2 |
| CSG (células/mm ³) | 51 | 37090 | 12000 | 71200 | 319.4 |
| CH (células/mm ³) | 51 | 30545 | 10400 | 60800 | 227.6 |
| proFO-total (D.O. 490 nm) | 51 | 0.575 | 0.084 | 2.170 | 0.008 |
| proFO-total/HT x10 ⁴ | 43 | 0.089 | 0.000 | 0.003 | 0.000 |
| Triacilglicéridos (mg/mL) | 60 | 0.446 | 0.036 | 1.081 | 0.028 |
| Glucosa (mg/mL) | 51 | 0.150 | 0.008 | 0.378 | 0.010 |
| Colesterol (mg/mL) | 60 | 1.397 | 0.461 | 3.463 | 0.094 |
| Lactato (mg/mL) | 57 | 0.083 | 0.018 | 0.216 | 0.006 |
| Calcio (mg/mL) | 57 | 0.382 | 0.035 | 0.884 | 0.023 |
| Proteínas (mg/mL) | 59 | 491.81 | 72.66 | 1568.49 | 58.794 |
| Espermatóforo (mg) | 34 | 17.96 | 2.50 | 47.10 | 0.377 |
| Glucógeno en pegoste (mg/g) | 22 | 8.52 | 0.75 | 17.32 | 0.187 |
| Glucógeno en masa esp. (mg/g) | 21 | 7.17 | 0.49 | 13.89 | 0.181 |
| Glucógeno en esp. Total (mg/g) | 13 | 8.34 | 2.91 | 20.07 | 0.367 |
| Porcentaje de normales (arse) | 29 | 51.19 | 11.31 | 78.10 | 0.744 |
| Porcentaje de anormales (arse) | 29 | 38.68 | 11.90 | 78.69 | 0.741 |
| Porcentaje de Muertos (arse) | 29 | 0.80 | 0.00 | 6.77 | 0.072 |
| E. Normales x10 ⁶ (células/mL) | 29 | 1.234 | 0.025 | 5.000 | 0.045 |
| E. Anormales x10 ⁶ (células/mL) | 29 | 0.614 | 0.075 | 2.450 | 0.023 |
| E. Muertos x10 ⁶ (células/mL) | 29 | 0.003 | 0.000 | 0.025 | 0.000 |
| E. Totales x10 ⁶ (células/mL) | 29 | 1.852 | 0.200 | 5.375 | 0.049 |

Anexo 5. Tabla de resultados de los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por 10 días a 33 °C.

| Medición | No. | Promedio | Mínimo | Máximo | ES |
|--|-----|----------|--------|--------|-------|
| Peso (g) | 61 | 28 | 19 | 39 | 0.565 |
| Capacidad osmótica (mOsm/kg) | 58 | -29 | -133 | 80 | 4.986 |
| HT (células/mm ³) | 45 | 49040 | 8611 | 99959 | 3442 |
| CG (células/mm ³) | 42 | 3787 | 1600 | 6400 | 192 |
| CSG (células/mm ³) | 42 | 20817 | 4800 | 50400 | 1465 |
| CH (células/mm ³) | 42 | 23319 | 3200 | 48000 | 1632 |
| proFO-total (D.O. 490 nm) | 56 | 0.520 | 0.056 | 1.470 | 0.043 |
| proFO-total/HT x10 ⁴ | 42 | 0.112 | 0.019 | 0.307 | 0.011 |
| Triacilglicéridos (mg/mL) | 58 | 0.355 | 0.014 | 1.040 | 0.024 |
| Glucosa (mg/mL) | 58 | 0.159 | 0.016 | 0.380 | 0.009 |
| Colesterol (mg/mL) | 58 | 1.406 | 0.313 | 5.476 | 0.127 |
| Lactato (mg/mL) | 57 | 0.077 | 0.003 | 0.500 | 0.010 |
| Calcio (mg/mL) | 54 | 0.622 | 0.032 | 1.886 | 0.044 |
| Proteínas (mg/mL) | 58 | 202.87 | 31.50 | 512.13 | 11.92 |
| Espermatóforo (mg) | 40 | 18.3 | 4.9 | 33.4 | 1.244 |
| Glucógeno en pegoste (mg/g) | 37 | 8.26 | 0.75 | 47.32 | 1.386 |
| Glucógeno en masa esp. (mg/g) | 37 | 6.55 | 0.49 | 24.25 | 0.814 |
| Porcentaje de normales (arse) | 38 | 20.57 | 0.00 | 78.10 | 4.318 |
| Porcentaje de anormales (arse) | 38 | 54.24 | 0.00 | 90.00 | 4.439 |
| Porcentaje de Muertos (arse) | 38 | 10.80 | 0.00 | 63.90 | 3.076 |
| E. Normales x10 ⁶ (células/mL) | 38 | 0.275 | 0.000 | 3.375 | 0.000 |
| E. Anormales x10 ⁶ (células/mL) | 38 | 0.520 | 0.000 | 9.000 | 0.000 |
| E. Muertos x10 ⁶ (células/mL) | 38 | 0.031 | 0.000 | 0.335 | 0.000 |
| E. Totales x10 ⁶ (células/mL) | 38 | 0.825 | 0.000 | 9.375 | 0.000 |

Anexo 6. Calidad espermática de los machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C.

| Día | N | | Espermatozoides x10 ⁶ | | | | | | |
|-------|----|----------|----------------------------------|-------------------|-----------|-------------------|---------|-------------------|-------------------|
| | | | Normales | % | Anormales | % | Muertos | % | Totales |
| 0 | 4 | Promedio | 1.64 | 75.6 ^a | 0.42 | 24.4 ^a | 0.00 | 0.0 ^a | 2.06 ^a |
| | | E.S | 0.60 | | 0.23 | | 0.00 | | 0.49 |
| 1 | 1 | Promedio | 0.30 | 92.3 ^a | 0.03 | 7.7 ^a | 0.00 | 0.0 ^a | 0.33 ^a |
| | | E.S | 0.00 | | 0.00 | | 0.00 | | 0.00 |
| 2 | 3 | Promedio | 0.38 | 50.5 ^a | 3.09 | 49.5 ^a | 0.00 | 0.0 ^a | 3.48 ^a |
| | | E.S | 0.04 | | 2.95 | | 0.00 | | 2.95 |
| 3 | 4 | Promedio | 0.08 | 10.7 ^b | 0.13 | 89.3 ^a | 0.00 | 0.0 ^a | 0.21 ^a |
| | | E.S | 0.08 | | 0.09 | | 0.00 | | 0.17 |
| 4 | 5 | Promedio | 0.31 | 25.0 ^b | 0.33 | 74.7 ^a | 0.01 | 0.3 ^a | 0.65 ^a |
| | | E.S | 0.18 | | 0.15 | | 0.01 | | 0.32 |
| 5 | 6 | Promedio | 0.05 | 18.5 ^b | 0.12 | 56.8 ^a | 0.08 | 24.7 ^a | 0.25 ^a |
| | | E.S | 0.04 | | 0.03 | | 0.06 | | 0.08 |
| 6 | 4 | Promedio | 0.00 | 1.2 ^b | 0.17 | 83.3 ^a | 0.04 | 15.6 ^a | 0.21 ^a |
| | | E.S | 0.00 | | 0.09 | | 0.02 | | 0.12 |
| 7 | 4 | Promedio | 0.00 | 0.0 ^b | 0.04 | 79.7 ^a | 0.01 | 20.3 ^a | 0.05 ^a |
| | | E.S | 0.00 | | 0.03 | | 0.01 | | 0.03 |
| 8 | 3 | Promedio | 0.08 | 5.3 ^b | 1.13 | 88.0 ^a | 0.01 | 6.7 ^a | 1.21 ^a |
| | | E.S | 0.04 | | 0.62 | | 0.01 | | 0.64 |
| 9 | 2 | Promedio | 0.00 | 0.0 ^b | 0.04 | 32.4 ^a | 0.09 | 67.6 ^b | 0.13 ^a |
| | | E.S | 0.00 | | 0.01 | | 0.03 | | 0.02 |
| 10 | 2 | Promedio | 0.00 | 0.0 ^b | 0.80 | 85.2 ^a | 0.14 | 14.8 ^a | 0.94 ^a |
| | | E.S | 0.00 | | 0.13 | | 0.01 | | 0.14 |
| Todos | 38 | Promedio | 0.27 | 23.0 | 0.52 | 65.0 | 0.03 | 12.0 | 0.83 |
| | | E.S | 0.10 | | 0.24 | | 0.01 | | 0.26 |

Promedios seguidos de diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Anexo 7. Índices bioquímicos (mg/mL) y capacidad osmótica hipo en machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C.

| Día | | Proteínas | Glucosa | Colesterol | Calcio | Lactato | Acilglicéridos | CO-HIPO |
|-------|----------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 0 | Promedio | 224.1 ^a | 0.212 ^a | 2.51 ^A | 1.09 ^a | 0.09 ^a | 0.40 ^a | -22.56 ^a |
| | E.S | 24.6 | 0.02 | 0.59 | 0.16 | 0.02 | 0.06 | 1.81 |
| 1 | Promedio | 241.5 ^a | 0.167 ^a | 1.39 ^A | 0.65 ^a | 0.07 ^a | 0.41 ^a | -25.25 ^a |
| | E.S | 91.6 | 0.03 | 0.35 | 0.14 | 0.02 | 0.09 | 2.45 |
| 2 | Promedio | 227.5 ^a | 0.171 ^a | 1.43 ^A | 0.96 ^{ab} | 0.08 ^a | 0.35 ^a | -50.20 ^{ab} |
| | E.S | 17.6 | 0.02 | 0.26 | 0.15 | 0.03 | 0.07 | 2.16 |
| 3 | Promedio | 191.1 ^a | 0.180 ^a | 1.14 ^B | 0.65 ^b | 0.08 ^a | 0.30 ^a | -70.67 ^{ab} |
| | E.S | 22.8 | 0.04 | 0.06 | 0.05 | 0.02 | 0.04 | 1.65 |
| 4 | Promedio | 266.2 ^a | 0.170 ^a | 1.00 ^B | 0.55 ^b | 0.08 ^a | 0.32 ^a | -24.80 ^a |
| | E.S | 31.6 | 0.04 | 0.17 | 0.06 | 0.02 | 0.04 | 0.90 |
| 5 | Promedio | 105.0 ^b | 0.071 ^b | 0.67 ^B | 0.38 ^b | 0.04 ^a | 0.15 ^a | -4.17 ^{ac} |
| | E.S | 24.1 | 0.02 | 0.09 | 0.10 | 0.01 | 0.04 | 0.62 |
| 6 | Promedio | 149.0 ^a | 0.169 ^a | 1.29 ^A | 0.40 ^b | 0.08 ^a | 0.41 ^a | -6.33 ^a |
| | E.S | 47.4 | 0.04 | 0.17 | 0.08 | 0.02 | 0.04 | 1.42 |
| 7 | Promedio | 145.5 ^a | 0.110 ^b | 1.09 ^B | 0.31 ^b | 0.19 ^a | 0.35 ^a | -55.40 ^a |
| | E.S | 35.6 | 0.01 | 0.24 | 0.05 | 0.08 | 0.09 | 2.59 |
| 8 | Promedio | 231.0 ^a | 0.192 ^a | 1.43 ^A | 0.60 ^b | 0.03 ^a | 0.39 ^a | -18.80 ^a |
| | E.S | 36.7 | 0.02 | 0.37 | 0.10 | 0.00 | 0.09 | 1.25 |
| 9 | Promedio | 211.0 ^a | 0.142 ^a | 1.52 ^A | 0.51 ^b | 0.05 ^a | 0.41 ^a | 16.00 ^{ac} |
| | E.S | 29.3 | 0.02 | 0.33 | 0.08 | 0.03 | 0.09 | 1.91 |
| 10 | Promedio | 235.4 ^a | 0.095 ^b | 1.13 ^B | 0.53 ^b | 0.04 ^a | 0.40 ^a | -44.00 ^{ac} |
| | E.S | 49.5 | 0.01 | 0.32 | 0.08 | 0.01 | 0.21 | 1.67 |
| Todos | Promedio | 202.9 | 0.159 | 1.41 | 0.62 | 0.08 | 0.35 | -28.71 |
| | E.S | 11.9 | 0.01 | 0.13 | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.57 |

Promedios seguidos de diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Anexo 8. Actividad de fenoloxidasa, hemocitos totales (HT) y subtipos celulares (Células granulares:CG, semigranulares: CSG y hialinas: CH) de machos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio por diez días a 33 °C.

| Día | | CG | % | CSG | % | CH | % | HT | FO-total | FO-plasma | Fototal/HT*10 ⁴ |
|-----|----------|-------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|
| 0 | Promedio | 0.40 ^a | 9.3 | 1.81 ^a | 42.2 | 2.08 ^a | 48.4 | 4.34 ^a | 0.59 ^a | 0.041 ^a | 0.12 ^a |
| | E.S | 0 | | 0.28 | | 0.6 | | 0.7 | 0.10 | 0.02 | 0.03 |
| 1 | Promedio | 0.41 ^a | 7.8 | 2.23 ^a | 42.7 | 2.59 ^a | 49.6 | 5.20 ^a | 0.47 ^a | 0.043 ^a | 0.18 ^a |
| | E.S | 0.07 | | 0.16 | | 0.26 | | 0.62 | 0.13 | 0.008 | 0.04 |
| 2 | Promedio | 0.40 ^a | 5.7 | 2.96 ^{ab} | 42.5 | 3.60 ^{ab} | 51.7 | 5.93 ^{ac} | 0.77 ^a | 0.023 ^a | 0.10 ^a |
| | E.S | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | 0.20 | 0.006 | 0.05 |
| 3 | Promedio | 0.45 ^a | 7.4 | 3.02 ^a | 50.1 | 2.56 ^a | 42.4 | 6.50 ^{ac} | 0.35 ^a | 0.014 ^a | 0.05 ^a |
| | E.S | 0.07 | | 0.63 | | 0.40 | | 1.25 | 0.08 | 0.002 | 0.01 |
| 4 | Promedio | 0.38 ^a | 7.3 | 2.28 ^a | 43.5 | 2.57 ^a | 49.2 | 5.61 ^{ac} | 0.47 ^a | 0.029 ^a | 0.10 ^a |
| | E.S | 0.05 | | 0.30 | | 0.38 | | 0.71 | 0.13 | 0.008 | 0.02 |
| 5 | Promedio | 0.34 ^a | 8.7 | 1.76 ^{ac} | 45.1 | 1.80 ^{ac} | 46.2 | 4.00 ^a | 0.66 ^a | 0.027 ^a | 0.09 ^a |
| | E.S | 0.06 | | 0.38 | | 0.34 | | 0.74 | 0.13 | 0.009 | 0.03 |
| 6 | Promedio | 0.22 ^a | 10.4 | 0.96 ^{ac} | 45.3 | 0.94 ^{ac} | 44.3 | 1.61 ^{ab} | 0.33 ^a | 0.013 ^a | 0.27 ^b |
| | E.S | 0.02 | | 0.33 | | 0.32 | | 0.47 | 0.09 | 0.001 | 0.04 |
| 7 | Promedio | 0.44 ^a | 8.6 | 2.16 ^a | 42.0 | 2.54 ^a | 49.4 | 5.35 ^{ac} | 0.36 ^a | 0.013 ^a | 0.14 ^a |
| | E.S | 0.02 | | 0.21 | | 0.52 | | 1.09 | 0.03 | 0.003 | 0.03 |
| 8 | Promedio | 0.41 ^a | 7.5 | 2.00 ^a | 36.2 | 3.11 ^a | 56.3 | 6.08 ^{ac} | 0.63 ^a | 0.031 ^a | 0.08 ^a |
| | E.S | 0.06 | | 0.28 | | 0.47 | | 1.01 | 0.16 | 0.011 | 0.02 |
| 9 | Promedio | 0.30 ^a | 10.9 | 1.14 ^{ac} | 42.1 | 1.28 ^{ac} | 47.1 | 3.38 ^a | 0.39 ^a | 0.029 ^a | 0.10 ^a |
| | E.S | 0.07 | | 0.34 | | 0.46 | | 0.94 | 0.17 | 0.003 | 0.03 |
| 10 | Promedio | 0.40 ^a | 6.1 | 3.20 ^a | 48.8 | 2.96 ^a | 45.1 | 6.52 ^{ac} | 0.64 ^a | 0.013 ^a | 0.11 ^a |
| | E.S | 0.08 | | 1.12 | | 0.96 | | 2.23 | 0.28 | 0.004 | 0.02 |

Promedios seguidos de diferente letra en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0.05$).