



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL CRECIMIENTO INDIVIDUAL EN
CAMARONES PENEIDOS COMO RESPUESTA A LAS TASAS DE INGESTIÓN Y
ABSORCIÓN DE ALIMENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS. *Litopenaeus*
vannamei COMO MODELO EXPERIMENTAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA

BIÓL. CLAUDIA GALICIA GONZÁLEZ.

DIRECTOR DE TESIS: DR. XAVIER CHIAPPA CARRARA.

COMITÉ TUTORAL: DRA. GABRIELA GAXIOLA CORTÉS.
DRA. ADELA MONREAL GÓMEZ.
DR. SERGIO CHÁZARO OLVERA.
DR. FERNANDO NUNO DIAS MARQUES SIMÕES.

MÉXICO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicatorias

Jamás imagine la aventura que se convertiría estudiar esta maestría. Como en toda aventura hubo momentos de fortuna y de adversidad pero al final quedaron sólo los buenos momentos, las lecciones aprendidas y las personas que son trascendentales. Algunas veces pensé que no llegaría este día, sin embargo gracias a cada uno de ustedes ahora puedo decir que lo logré, cada uno de ustedes ha formado parte de mi vida y les quiero agradecer por ello, espero que sigan formando parte de ella y les dedico este humilde trabajo con todo mi cariño.

A las personas más importantes a quienes les debo todo lo que soy y más: mis padres: Adelita y Vicente por que siempre nos han apoyado incondicionalmente en todo; mis hermanos: Tomás, Toña, July, Ray, Amenda y Eli no hay palabras para agradecer todos los sacrificios que han hecho por mí, mis hermosos sobrinos Sayu, Emmanuel, Iván, Obett, Aramis y Alex por su inocencia, sabiduría gracias por acompañarme en este camino y hacerme reír! Sayu y Emma: ya se fue “el fantasma de la tesis” y sólo hizo una.

Con cariño, respeto y admiración a quien me dio la oportunidad de seguir en este camino de superación y se arriesgo a aceptarme nuevamente como su alumna: Dr. Xavier Chiappa Carrara, gracias por creer en mí, por su infinito apoyo, su enorme paciencia y sobre todo por su amistad, sin su tenacidad no lo habría logrado.

A Maribel Badillo y Alfredo Gallardo por su enorme apoyo su cariño y la fe que siguen teniendo en mí, gracias por sus palabras de apoyo en los momentos más difíciles.

A Rosalina por que eres una persona admirable, por todas tus palabras de apoyo y por tu amistad.

A quién empezó conmigo la aventura de la maestría en Sisal, por todos los momentos de angustia, diversión, risas, lágrimas compartidos, gracias Cecy por soportarme tantoooo tiempo: toritoooo !!

A la familia Valenzuela Durruty: Claudia, Manuel, Vero y Rebeca porque siempre estuvieron para apoyarme y siempre me hicieron sentir como en familia, gracias por todo.

A Paloma, Adry por su cariño y porque la estancia en tierras yucatecas no habría sido tan amena, divertida y porque siempre estuvieron para escuchar.. Gracias!!

A la Familia Apodaca Arena: Bety, Tyson porque también se convirtieron en buenos amigos, y compartieron un pedacito de sus vidas. Y claro no podía faltar la dedicatoria a mi amiguita: Marina Bratz.!

A la Sra. Josefina Quiñones, por su gran apoyo durante mi estancia en Sisal, por escucharme y hasta ayudarme en mi experimento, pero sobre todo por convertirse en una buena amiga.

A Tere Rangel y familia por soportarme durante mucho tiempo, por las palabras de apoyo en los momentos más difíciles, por darme asilo político cada vez que había que cambiar de casa y sobre todo por su amistad!

Julio César, Mily, Julio y Ken, por compartir su familia, jamás olvidaré lo que hicieron por mí, en los momentos más difíciles!!

A Ariadna, Gemma, Vianey, Josué por su hospitalidad, amistad y apoyo en los momentos más difíciles, incluyendo las mudanzas!!!!

A mis maestros quienes han permanecido cerca, Dra. Paty Velasco, Magdalena Ordoñez, Cristóbal Galindo, Genaro Altamirano, Fernando Tapia, Paty Rivera, Paty Rosas, Beticia López y Angeles Salván.

No podían faltar mis compañeros y amigos, los que siempre han estado cerca para escuchar todos mis traumas, planes y locuras: Adriana Cabrera, Mariana Cartagena, Eloir, Ernest, Inesa, Miriam, Bárbara, Angye, Feimy, Flor, Claudia De Teodoro, Yadira, Lalo, Pau, Genaro M, Paty de Anda, Paty Miranda., los que me dieron su sangre: Miguel Ángel M, Ulises B., los que han regresado: Paola, Alex, Iván y Sergio, los nuevos: Andresius, Glendy, Eliab, Jaime, Renne, Luis Cunha, Carmen Galindo, Virginia, Gerardo González, Braulio, Susy, Luz, Cecy R, Sebastián, Segio U., Fernando J, Daniel H, Reyna, Mario Cámara y todos los que faltan!!!

Y Claro me falta mi amiga de la mala suerte en Sisal-Yucatán: Miroslava, gracias por olvidar echarle gasolina a nuestro transporte de no ser así nos habríamos perdido de tantas aventuras carreterescas!

Finalmente quiero agradecer a una persona que estuvo en los inicios de mis experimentos, trataba de inyectar ánimo a todos, nunca me diste mi título de Ingeniero: Kike, a donde sea que te hayas ido: mil gracias!

Cuando empecé a escribir estas dedicatorias, recordé todo lo que ha estado ligado a este trabajo y no tengo palabras para poder expresar todo mi agradecimiento, tengo demasiada suerte en haber conocido a cada uno de ustedes, todos son especiales para mí.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la intervención de innumerables personas, a cada uno de ustedes les expreso mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Xavier Chiappa Carrara por la dirección, asesoría y apoyo técnico para la realización de ésta tesis. Así mismo, también quiero agradecerle el apoyo para asistir a congresos.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Gabriela Gaxiola, Dra. Adela Monreal, Dr. Sergio Cházaro y Dr. Nuno Simões, por sus valiosos comentarios, aportaciones que enriquecieron este trabajo y por su disposición en apoyarme en todo.

Al Dr. Thierry Brulé Demarest por su apoyo y las facilidades prestadas para utilizar las instalaciones del Laboratorio de Ictiología que dirige en el CINVESTAV.

A la Dra. Gabriela Gaxiola Cortés por su apoyo para la realización de este proyecto, por su inmensa ayuda para la parte de bioquímica y su especial interés en enseñarme que todos los experimentos son valiosos. Espero que los japoneses sí me contraten!

Al equipo de modelación por inyectar su gusto en la investigación, los comentarios hacia este trabajo, por su ayuda y disposición en enseñar: Dr. Pedro Duarte da Silva (Universidade Fernando Pessoa), Dr. Nuno Simoes, Dr. Xavier Chiappa Carrara (UMDI-Sisal) y M. en C. Armando Cervantes Sandoval (FES-Z).

A los revisores de este trabajo que no forman parte del jurado, al Dr. Gerard Cuzón (IFREMER) por sus comentarios y aportaciones especialmente en la parte de bioquímica. A la Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui (UMDI-Sisal), por sus valiosos comentarios durante el desarrollo de este trabajo y su ayuda en la estadística así como por el apoyo para asistir a congresos.

A los técnicos académicos de la UMDI-Sisal, Biól. Manuel Valenzuela Jiménez, Biól. Gabriela Palomino Albarrán, Ing. Adriana Paredes Medina, Ing. Miguel Arévalo López, Ing. Luis Enrique Hidalgo Arcos, Ing. Eliodoro Hernández Hernández, Biól. Gabriel Taboada Domínguez, M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga, Ing. Vianey Sosa Koh, M. en C. Maribel Badillo Alemán y M. en C.

Alfredo Gallardo Torres, por su apoyo técnico en las diferentes etapas de este trabajo.

A Teresa Colás Marrufo por su apoyo técnico en la realización de los cortes histológicos.

Al personal y alumnos del laboratorio de ictiología del CINVESTAV-Mérida, por su apoyo y ayuda durante mi estancia.

A todos los académicos y personal administrativo de la UMDI- Sisal por su ayuda en todo momento.

A mis compañeros: Carlos Maldonado, Cecilia Martínez, Andrés Altamira, Carmen Galindo por su apoyo en los experimentos.

A Lupita Godoy, Chantal Guerrero, Gabry Almaraz y Diana Juárez, personal de la coordinación del ICMyL por su disposición y por todas las facilidades otorgadas para la realización de trámites durante mi estancia en el posgrado.

A Industrias Pecis S. A. de C. V., por el aporte de los reproductores, progenitores de los camarones con los que se llevaron a cabo los experimentos de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Posgrado.

A la DGEP por la beca complemento otorgada durante mis estudios de maestría.

Al financiamiento de los proyectos PAPIIT-DGAPA-UNAM (IX219404) y CONACyT-Ciencia Básica (44602-Q).

A la UNAM, y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por darme la oportunidad de superarme académicamente.

A la UMDI-Sisal y CINVESTAV-Mérida, por las facilidades otorgadas para la realización de los experimentos.

ÍNDICE

índice de figuras.....	i
índice de tablas.....	iii
1. Resumen.....	2
2. Introducción general.....	3
2.1 Biología del camarón	
2.1.1 Morfología externa.....	7
2.1.2 Ciclo de vida.....	8
2.1.3 Clasificación taxonómica.....	9
CAPÍTULO I	
3. Introducción y antecedentes.....	10
3.1 Modelación del crecimiento y bioenergética.....	10
3.2 Anatomía y fisiología del sistema digestivo de camarones peneidos.....	19
3.3 Digestión.....	25
4. Hipótesis.....	27
5. Objetivos.....	27
6. Material y Métodos	
6.1. Tasas de crecimiento, ingestión y absorción.	
6.1.1 Obtención y mantenimiento de los organismos.....	28
6.1.2 Diseño experimental.....	28
6.1.3 Tasas de ingestión y absorción.....	30
6.1.4 Pruebas de lixiviación	31
6.1.5 Tasas de crecimiento.....	32
6.1.6 Análisis de datos.....	32
6.2. Volumen del tracto digestivo	
6.2.1 Cortes histológicos.....	32
6.2.2 Manejo de imágenes para estimar el volumen del tracto digestivo.....	33

7. Resultados	
7.1. Tasas de ingestión, absorción y crecimiento.	
7.1.1 Supervivencia.....	35
7.1.2 Temperatura en el sistema experimental.....	36
7.1.3 Tasas de ingestión y absorción.....	36
7.1.3.1 Organismos en Postmuda.....	37
7.1.3.2 Organismos en Intermuda.....	39
7.1.3.3 Resultados para los organismos al final del experimento.....	41
7.1.4 Crecimiento.....	43
7.1.5 Aplicaciones al modelo.....	44
7.2. Volumen del tracto digestivo.....	46
8. Discusión	
8.1. Ingestión y absorción.....	50
8.2. Crecimiento.....	52
8.3. Aplicaciones al modelo.....	54
8.4. Volumen del tracto digestivo.....	56
CAPITULO II.	
9. Introducción y antecedentes.....	59
10. Hipótesis.....	66
11. Objetivos.....	66

12. Material y métodos	
12.1 Diseño experimental.....	67
12.2 Muestreo de los organismos.....	68
12.3 Evaluación del glucógeno.....	70
12.4 Evaluación de la actividad enzimática.....	71
12.4.1 Preparación del homogenado.....	71
12.4.2 Evaluación de la actividad de la tripsina.....	71
12.4.3 Evaluación de la α -amilasa.....	72
12.4.4 Evaluación de proteínas.....	72
12.5 Análisis de datos.....	73
13. Resultados	
13.1 Temperatura en el sistema experimental.....	74
13.2 Presión osmótica.....	75
13.3 Hemocianina.....	76
13.4 Glucosa.....	77
13.5 Glucógeno.....	78
13.6 Proteínas.....	79
13.7 Actividad enzimática.....	81
14. Discusión.....	84
15. Conclusiones generales.....	89
16. Referencias.....	92
17. Anexos	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía externa de un camarón peneido.....	7
Figura 2. Etapas del ciclo vital de un camarón peneido.....	8
Figura 3. <i>Litopenaeus vannamei</i>	9
Figura 4. Modelo diagramático de la bioenergética individual.....	12
Figura 5. Diagrama conceptual del modelo dinámico de crecimiento de camarones peneidos.....	14
Figura 6. Módulo de alimentación del modelo general de crecimiento de camarones peneidos.....	18
Figura 7. Disección lateral del tracto digestivo.....	19
Figura 8. Corte transversal de la cámara anterior del proventrículo a través del esófago.....	20
Figura 9. Sección transversal a través de la cámara posterior del proventrículo.....	21
Figura 10. Corte histológico de la estructura del intestino medio.....	22
Figura 11. Corte histológico transversal del intestino medio.....	23
Figura 12. Diagrama hipotético generalizado de la circulación de los productos de la glándula digestiva.....	26
Figura 13. Diagrama del sistema diseñado para estimar las variaciones de respuesta de crecimiento debidas a la temperatura.....	29
Figura 14. Sistema experimental.....	30
Figura 15. Disposición de los organismos en los acuarios experimentales.....	30
Figura 16. Procesamiento de las imágenes para calcular el volumen del tracto digestivo.....	34
Figura 17. Variación de la temperatura en el sistema experimental.....	36
Figura 18. Relación entre la temperatura y las tasas de ingestión de alimento en organismos de <i>L. vannamei</i> durante la postmuda.....	37
Figura 19. Relación entre la temperatura y las tasas de absorción de alimento en organismo de <i>L. vannamei</i> en postmuda.....	38

Figura 20. Relación entre la temperatura y las tasas de ingestión de alimento en organismos <i>L. vannamei</i> en período de intermuda.....	39
Figura 21. Relación entre la temperatura y las tasas de absorción de alimento en organismos <i>L. vannamei</i> en período de intermuda.....	40
Figura 22. Relación entre la temperatura y las tasas de ingestión de alimento en organismos <i>L. vannamei</i>	41
Figura 23. Relación entre la temperatura y las tasas de absorción de alimento en organismos <i>L. vannamei</i>	42
Figura 24. Relación entre la temperatura y las tasas de crecimiento de <i>L. vannamei</i>	43
Figura 25. Diagrama en Stella que simula el crecimiento de <i>L. vannamei</i>	45
Figura 26. Fotografía que muestra la morfología macroscópica del tracto digestivo de <i>L. vannamei</i>	46
Figura 27. Secuencia de cortes histológicos para la reconstrucción del tracto digestivo de <i>L. vannamei</i> . (Organismo I).....	47
Figura 28. Cortes histológicos para la reconstrucción del tracto digestivo de <i>L. vannamei</i> . (Organismo II).....	48
Figura 29. Tasas de ingestión para organismos de <i>L. vannamei</i>	49
Figura 30. Esquema del comportamiento de la actividad enzimática con respecto a la temperatura.....	63
Figura 31. Estadios del ciclo de muda en base a los cambios setales de los urópodos.....	64
Figura 32. Extracción de hemolinfa.....	68
Figura 33. Manejo de muestras para las evaluaciones bioquímicas.....	68
Figura 34. Obtención del urópodo para determinar el estadio de muda.....	70
Figura 35. Vista microscópica de un urópodo.....	70
Figura 36. Variación de la temperatura (°C) en el sistema experimental....	74
Figura 37. Variaciones de la capacidad osmótica en función del estadio de muda.....	75

Figura 38. Variaciones de la concentración de hemocianina en función del estadio de muda.....	76
Figura 39. Concentración de glucógeno en glándula digestiva de <i>L. vannamei</i> en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.	78
Figura 40. Concentración de proteínas (log X+1) en glándula digestiva de <i>L. vannamei</i> en diferentes condiciones estadios de muda.....	80
Figura 41. Actividad enzimática de la tripsina de <i>L. vannamei</i> en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.....	81
Figura 42. Actividad enzimática de la α -amilasa de <i>L. vannamei</i> en diferentes estadios de muda.....	83

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia semanal para cada una de las temperaturas evaluadas.....	35
Tabla 2. Medidas morfométricas y ponderales de los organismos y de los tractos digestivos a los cuáles se les evaluó el volumen interno.	46
Tabla 3. Análisis de varianza bifactorial de la capacidad osmótica en función de la temperatura y estadio de muda.	75
Tabla 4. Análisis de varianza bifactorial de la concentración de glucosa en sangre de <i>L. vannamei</i> en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.....	77
Tabla 5. Análisis de varianza bifactorial de la concentración de proteínas solubles en hepatopáncreas <i>L. vannamei</i> en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.....	79
Tabla 6. Análisis de varianza bifactorial de la actividad enzimática de la α -amilasa de <i>L. vannamei</i> en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.....	82

1. RESUMEN

En el presente trabajo se estimaron las tasas de ingestión, absorción y crecimiento individual en juveniles de *L. vannamei*, en función de la temperatura. Estos parámetros son necesarios para la parametrización del módulo de alimentación que forma parte de un modelo matemático para describir el crecimiento individual de estos decapódos desde el punto de vista bioenergético, considerando además el ciclo de muda como el proceso que determina su crecimiento. El módulo de alimentación exige conocer un indicador de saciedad que permita definir la duración del evento alimentario. En este trabajo se generó la metodología para calcular el volumen interno del tracto digestivo de *L. vannamei* como un posible indicador de saciedad. Así mismo se analizó el efecto de los factores controladores del crecimiento y metabolismo en crustáceos: la temperatura y el ciclo de muda sobre el medio interno, metabolitos y enzimas digestivas. Los resultados obtenidos experimentalmente evidenciaron un efecto significativo de la temperatura sobre el crecimiento individual de *L. vannamei* dentro del intervalo óptimo (26, 29 y 32 °C). Los parámetros obtenidos en este trabajo se utilizaron para correr el modelo general de crecimiento. El modelo hasta ahora subestima el crecimiento de *L. vannamei* ya que predice un camarón de 30 g al término de un año. La respuesta sinérgica del ciclo de muda y de la temperatura únicamente se evidenció para el glucógeno hepatopancreático. El ciclo de muda fue el factor más importante para explicar los cambios en el medio interno, la capacidad osmótica, la concentración de hemocianina y proteínas en el hepatopáncreas. La actividad de la enzima digestiva (α -amilasa) también respondió a este factor. La concentración de glucosa en la hemolinfa y la actividad de la tripsina no fueron afectadas por ninguno de los dos factores. Así, los organismos son más sensibles a los cambios ocasionados por el estrés del ciclo de muda que a las variaciones de la temperatura dentro del preferendum térmico de esta especie.

Palabras clave: modelo, camarón, ingestión, crecimiento, muda, temperatura.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

En los sistemas costeros como las lagunas, estuarios y marismas se ha practicado tradicionalmente la pesca y entre las especies de interés económico destaca el camarón (Gamez y de la Lanza, 1992).

El camarón es uno de los recursos pesqueros más preciados a nivel mundial, por lo cual alcanza un gran valor por unidad de peso. La demanda de este crustáceo es elevada, principalmente en los países de alto nivel económico como los Estados Unidos, Japón y la Comunidad Económica Europea. Debido a esto alcanza una importancia económica comparativamente alta en la producción pesquera mundial, a pesar de que sólo representa un 2.5 % de la captura total (Gracia, 2004).

Sin embargo, su captura ha llegado al máximo nivel en donde el rendimiento de las pesquerías ha disminuido debido principalmente a la pérdida de manglares y a la sobreexplotación¹. La necesidad de contar con alimento para consumo humano ha llevado a la búsqueda de opciones para satisfacer la demanda de estos recursos, encontrando en el cultivo una alternativa con excelentes resultados (Gamez y de la Lanza, 1992; SAGARPA, 2003, 2004).

El cultivo de camarón o camaronicultura, es una de las ramas de la acuicultura que más se han desarrollado en los últimos años. En tan solo quince años (1980-1995) la producción aumentó de 60 000 a 700 000 toneladas lo que representa un crecimiento de aproximadamente un 1167%. En la actualidad, los países que ocupan los primeros lugares en la producción de camarón por cultivo son: dentro de los países orientales, Tailandia, Indonesia e India, mientras que en los países Occidentales el cultivo de camarón se ha desarrollado considerablemente en Ecuador, México, Honduras, Panamá, Colombia, Perú, Venezuela, Nicaragua, Brasil, Costa Rica, Guatemala y Belice (Roseberry, 1996; Martínez, 1999).

¹ Se ha considerado que algunas posibles causas por las cuales el rendimiento ha disminuido son la disminución de la biomasa poblacional (debida a perturbaciones en la reproducción y en el reclutamiento) y el aumento del esfuerzo pesquero.

En el año 2000 la producción acuícola alcanzó los 45.71 millones de toneladas métricas valuadas en 56.47 mil millones de dólares. Más de la mitad de la producción total se concentró en peces (50.4%) seguida por moluscos (23.5%), plantas acuáticas (22.3%) crustáceos (3.6%), anfibios y reptiles (0.22%), el 0.08% restante estuvo representado por otros invertebrados. Si bien los crustáceos (los cuales comprenden camarones peneidos principalmente) representan sólo el 3.6% de la producción total en peso, en términos de valor comprendió el 16.6% para este año (FAO, 2003).

En México, el camarón es el recurso pesquero más importante, ya que su explotación constituye una actividad muy relevante desde el punto de vista social y económico. Debido a su valor y demanda nacional e internacional la explotación del camarón es también fuente importante de empleos y divisas. Aunque en términos de volumen de captura por lo general ocupa entre el cuarto y sexto lugar en la producción pesquera nacional, su valor por unidad de peso lo coloca en el primer lugar. El valor de la producción pesquera anual de camarón varía entre el 30 y 40% del valor total de la producción pesquera total del país. En ambas costas del país se captura este crustáceo con una producción total que fluctúa alrededor de 70,000 toneladas anuales (Gracia, 2004).

El éxito económico del cultivo de camarón depende de muchos factores que se pueden agrupar en dos rubros, el primero incluye aquéllos que están relacionados con el proceso de cultivo *per se*, el tipo de cultivo, las características del sitio, el clima, la calidad del agua, el alimento, tecnología usada, los recursos capitales y humanos, los costos de producción y el manejo del cultivo; los otros factores están relacionados con la biología de las especies a cultivar, incluyendo el sexo, edad y la resistencia a enfermedades (Carvajal y Nebot, 1998).

En la actualidad existen más de 25 especies de camarones que se están utilizando a nivel comercial o experimental para su cultivo entre los que destacan los camarones peneidos, sin embargo, se considera que hay muchas otras potencialmente explotables (Martínez, 1999).

Entre las especies cultivables más importantes se encuentran el camaroncillo akiame (*Acetes japonicus*), el camarón tigre (*Penaeus monodon*), el langostino carnoso

(*Penaeus chinensis*) y el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (FAO - FishStat Plus, 2006).

El cultivo de camarón en México está fundamentado en cuatro especies: el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), el camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*), el camarón café del Pacífico (*Farfantepenaeus californiensis*) y el camarón blanco del Golfo (*Litopenaeus setiferus*). Otras especies que se han considerado para su cultivo son: el camarón café del Atlántico (*Farfantepenaeus aztecus*) y el camarón rosado (*Farfantepenaeus duorarum*) (Alfonso *et al.*, 1993; Martínez, 1999).

Entre las características que hacen adecuadas a las especies de camarón blanco del Pacífico y camarón azul para ser cultivadas destacan: su amplia tolerancia a la salinidad, amplio espectro alimentario y la facilidad de obtener hembras silvestres fertilizadas, lo cual ha coadyuvado a la obtención de larvas en condiciones de laboratorio (Alfonso *et al.*, 1993).

Particularmente para el Golfo de México las especies de camarón blanco del Golfo y camarón café del Atlántico son objeto de numerosas investigaciones para lograr que su cultivo sea exitoso (Rosas *et al.*, 2002a). Los camarones peneidos son considerados de gran importancia en el ámbito mundial debido a su valor comercial y, a pesar del éxito que ha tenido su cultivo en granjas, todavía no se han agotado las posibilidades de acrecentar los conocimientos básicos sobre la biología de estos organismos y hacer más eficientes los sistemas de producción y comercialización (Jia *et al.*, 2002). Entre estos conocimientos destacan los factores biológicos que determinan la interrelación entre la tasa de crecimiento y tasa de ingestión que, a su vez, dependen de la especie, del ciclo de muda, del estado de salud del organismo y el estado de saciedad.

Además, se encuentran los factores externos que influyen los procesos metabólicos de los organismos. La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan a los organismos acuáticos, ya que determina el metabolismo general de los organismos poiquilotermos (Brey, 1995).

El conocimiento de estos factores permitiría modelar predictivamente la tasa de crecimiento individual de un organismo mantenido en condiciones de cultivo. El uso de modelos predictivos, además de ayudar en el proceso del entendimiento del fenómeno biológico que se pretende modelar, tiene aplicaciones potenciales reales en la industria, permitiendo la previsión del crecimiento poblacional en un estanque teniendo en cuenta las variables biológicas y ambientales involucradas en el proceso (Arias, 2007).

Este trabajo se divide en dos capítulos, en el primer capítulo se analizan desde un punto de vista bioenergético cómo el alimento consumido y absorbido se expresa como crecimiento somático en los organismos, y el efecto de la temperatura sobre el crecimiento. Así mismo se propone una metodología para calcular el volumen del tracto digestivo que puede ser un indicador de saciedad en el proceso alimentario.

En el segundo capítulo, manteniendo a la temperatura como factor controlador de los procesos internos de los organismos, se analiza la respuesta del medio interno fisiológico de *L. vannamei* considerando otro factor controlador del metabolismo de los crustáceos: el ciclo de muda.

2.1 BIOLOGÍA DEL CAMARÓN

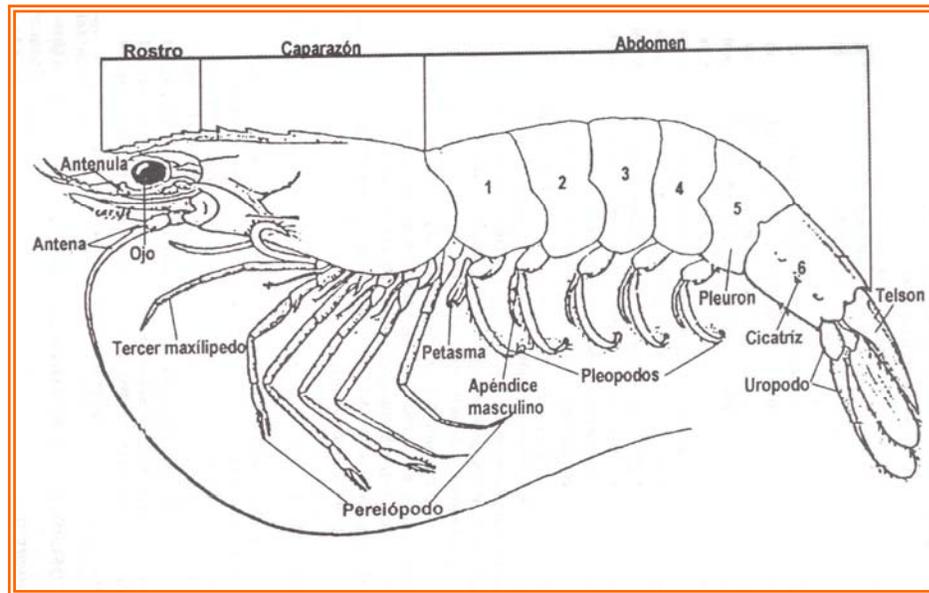


Figura 1. Anatomía externa de un camarón peneido. (Martínez, 1999).

2.1.1. MORFOLOGÍA EXTERNA

El cuerpo de los camarones (Figura 1) se divide en tres regiones: cefalotórax, abdomen y telson. Los apéndices del cefalotórax son las anténulas, antenas, mandíbulas, maxilas, maxilípedos y periópodos; el abdomen está formado por seis segmentos y seis pares de apéndices llamados pleópodos cuya función es natatoria. En el telson se encuentran los urópodos, que sirven también para la natación. El exoesqueleto que está en la región del cefalotórax, presenta diferentes procesos u ornamentaciones como espinas, suturas y surcos, cuya forma, tamaño y distribución es característica para cada especie (Martínez, 1999).

La familia Penaeidae, se caracteriza por tener el cuerpo poco a considerablemente comprimido, rostro por lo general bien desarrollado y comprimido lateralmente, serrado; pedúnculos oculares modulados a muy alargados, anténulas con dos flagelos (Martínez, 1999).

2.1.2. CICLO DE VIDA

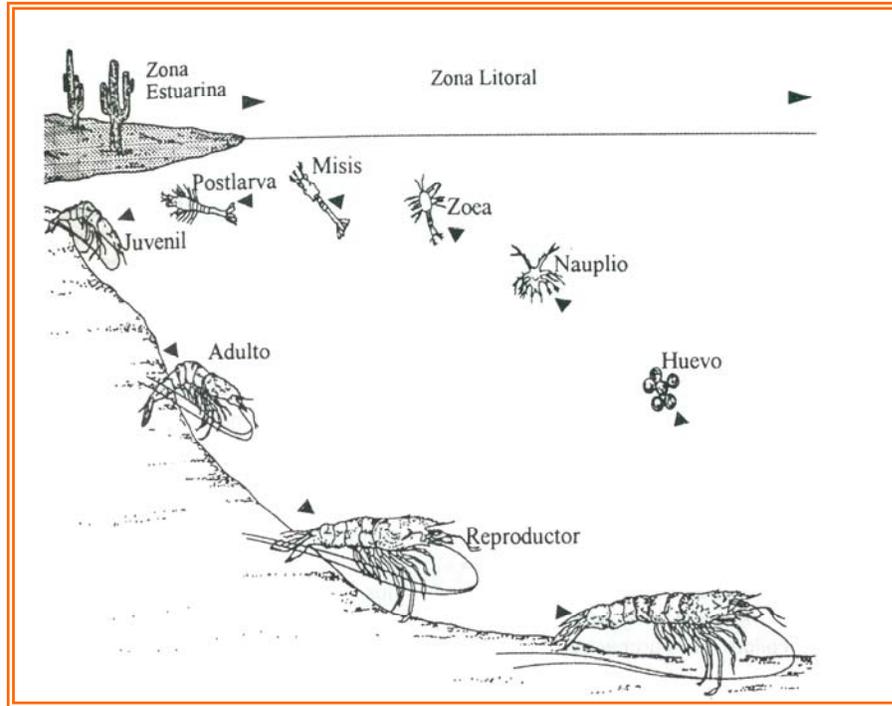


Figura 2. Etapas del ciclo vital de un camarón peneido. (Martínez, 1999).

El ciclo de vida del camarón puede ser dividido en dos fases: la marina y la estuarina. La reproducción del camarón comienza en aguas alejadas de la costa, cuando el macho deposita en la hembra un paquete de esperma que fertiliza los huevos a medida que son puestos. Luego los huevos maduran y pasan a través de una serie de estadios larvales: nauplio, zoea y mysis, posteriormente alcanzan el estadio de post-larva que asemeja a un camarón adulto. Luego las post-larvas se mueven en dirección a la costa hacia los estuarios de los ríos, donde se desarrollan rápidamente ya que encuentran una mayor disponibilidad de alimento, menor salinidad, mayores temperaturas y protección contra los depredadores (Figura 2).

Después de sucesivas mudas, las post-larvas se transforman en juveniles manteniéndose en los estuarios de los ríos durante un lapso de 3 a 4 meses. Posteriormente comienzan a migrar al mar donde su crecimiento es más rápido. El desove tiene lugar en la temporada cálida, el número de huevos por desove fluctúa entre los 500 000 - 1000 000. Existe evidencia de que las hembras desovan más de una vez. La longevidad del camarón es de 12 meses aproximadamente, pero algunos llegan a los dos años (Morales, 1994).

2.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

Los camarones son artrópodos mandibulados con apéndices birrameados articulados, con dos pares de antenas, caparazón y branquias. En las fases larvales se presentan los nauplios.

La especie *Litopenaeus vannamei* se clasifica de acuerdo con Pérez-Farfante y Kensley (1997) como:

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

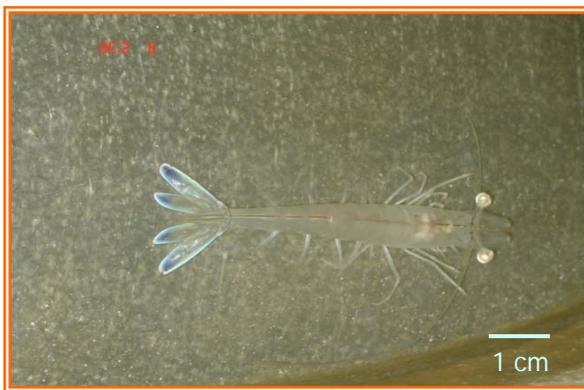


Figura 3. *Litopenaeus vannamei*.

Litopenaeus vannamei (Figura 3) es una especie nativa de las costas del Pacífico de América del Sur y América Central (desde Sonora, en el Golfo de California, México, hasta Perú en Sudamérica). Se encuentra en forma silvestre en aguas costeras de 0 hasta 72 m de profundidad sobre fondos fangosos. Esta especie tiene preferencia por las aguas marinas en su vida de adulto y por aguas estuarinas desde postlarva hasta juvenil (Martínez, 1999).

Dentro de las especies cultivadas es una de las más buscadas y, en los países occidentales representa más del 95% de la producción. En condiciones de cultivo, la alimentación de *L. vannamei* incluye organismos que crecen naturalmente en los estanques, por lo que el costo de producción es menor que el de otras especies como *P. monodon*. El camarón blanco tiene un índice de crecimiento uniforme y llegan a tener una longitud máxima de 230 milímetros. La sobrevivencia en el cultivo es alta, de 50 a 60% (Martínez, 1999).

CAPÍTULO I

3. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

3.1 MODELACIÓN DEL CRECIMIENTO Y BIOENERGÉTICA

Los intentos de modelación del crecimiento en artrópodos en general y peneidos en particular se han enfrentado al hecho de que, para que ocurra un aumento del tamaño de estos animales, es necesario que periódicamente¹ se libere el tejido conectivo entre la epidermis y la cutícula extracelular mediante el proceso de ecdisis, conocido también como “muda” (Botsford, 1985). Éste es un proceso complejo para el que un organismo se prepara durante varios días mediante el despliegue de cambios bioquímicos y fisiológicos controlados hormonalmente (Skinner, 1985 b). Evidencias como las de Choe (1971), Dall (1986) y Carvalho y Phan (1998) indican que los camarones peneidos cesan el conjunto de procesos alimentarios dos días antes de la muda. Durante las fases iniciales de este proceso, de acuerdo con la descripción de New (1976), los organismos pierden el exoesqueleto y bombean agua para expandir la superficie sobre la que se genera el nuevo esqueleto, que se endurece mediante la absorción de minerales y proteínas (Chang, 1992). En este estadio, los organismos acrecientan su volumen más no su biomasa. La recurrencia de este proceso tiene como consecuencia un tipo de crecimiento discontinuo y es en los periodos de intermuda cuando ocurre el catabolismo neto de los tejidos y la pérdida del agua bombeada.

Dentro de las aproximaciones más detalladas que se han hecho para modelar el crecimiento de camarones peneidos destaca el trabajo de Mishra *et al.* (2002). Estos autores desarrollaron un modelo para predecir el crecimiento de los camarones bajo un amplio espectro de variables tales como el efecto de la cantidad y calidad nutricional del alimento, de los cambios en la composición corporal de los camarones en distintos momentos del ciclo de vida en general, así como en las distintas fases del ciclo de muda en particular. Sin embargo este modelo de crecimiento está basado en un esquema desarrollado por Van Dam y Penning de Vries (1995) para peces el cual fue calibrado, validado y parametrizado con datos independientes provenientes de la literatura dando como resultado una sobreestimación en el crecimiento.

¹ Esta periodicidad depende de un gran número de factores, entre ellos la talla, la especie, temperatura, entre otros. Para organismos de *L. vannamei* de 11.3 a 13 cm y a 22° C el ciclo dura de 28 a 40 días (Chan *et al.*, 1988).

La aproximación hecha por Mishra *et al.* (2002), al igual que otros trabajos que se han realizado para modelar el crecimiento de camarones, está basada en la bioenergética debido a que, para poder estimar el crecimiento individual de los organismos es necesario entender todos los mecanismos por los cuales el alimento se transforma en energía y se distribuye hacia todos los procesos vitales hasta finalizar en una ganancia en crecimiento somático.

La bioenergética se define como la estimación de intercambios y transformaciones de materia y energía entre los organismos y su medio ambiente (Lucas, 1996). La bioenergética ayuda a comprender cómo se lleva a cabo dentro de un organismo la distribución de la energía hacia sus distintas vías metabólicas, así como la demanda reproductiva, a la conducta y al crecimiento. Ese conocimiento se relaciona con la asignación de recursos en términos de las estrategias de la historia de vida, las cuales incluyen los procesos de migración así como los patrones estacionales de alimentación y de reproducción (Adams y Breck, 1990).

El balance energético es aplicado en muchas áreas de la biología para una gran variedad de propósitos. Las aplicaciones comunes del balance de energía se han enfocado a la estimación del crecimiento o producción en el cultivo de especies acuáticas de importancia económica (Adams y Breck, 1990).

La bioenergética se basa en el hecho de que la energía adquirida a través de la ingestión de alimentos tiene diferentes destinos, puede ser utilizada para procesos catabólicos o depositada como nuevo tejido corporal (crecimiento) y también puede eliminarse como desechos en las heces o por excreción. Por lo tanto, la bioenergética (Figura 4) considera el examen de las pérdidas, ganancias y transferencia de energía en el organismo (Windell, 1978).

El conocimiento de la bioenergética en el camarón es escaso. Se necesita más información para conocer el balance energético en distintas condiciones de alimentación y su efecto en el crecimiento, composición corporal, estados de desarrollo y factores ambientales tales como: temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto entre otros (Mishra, 2002).

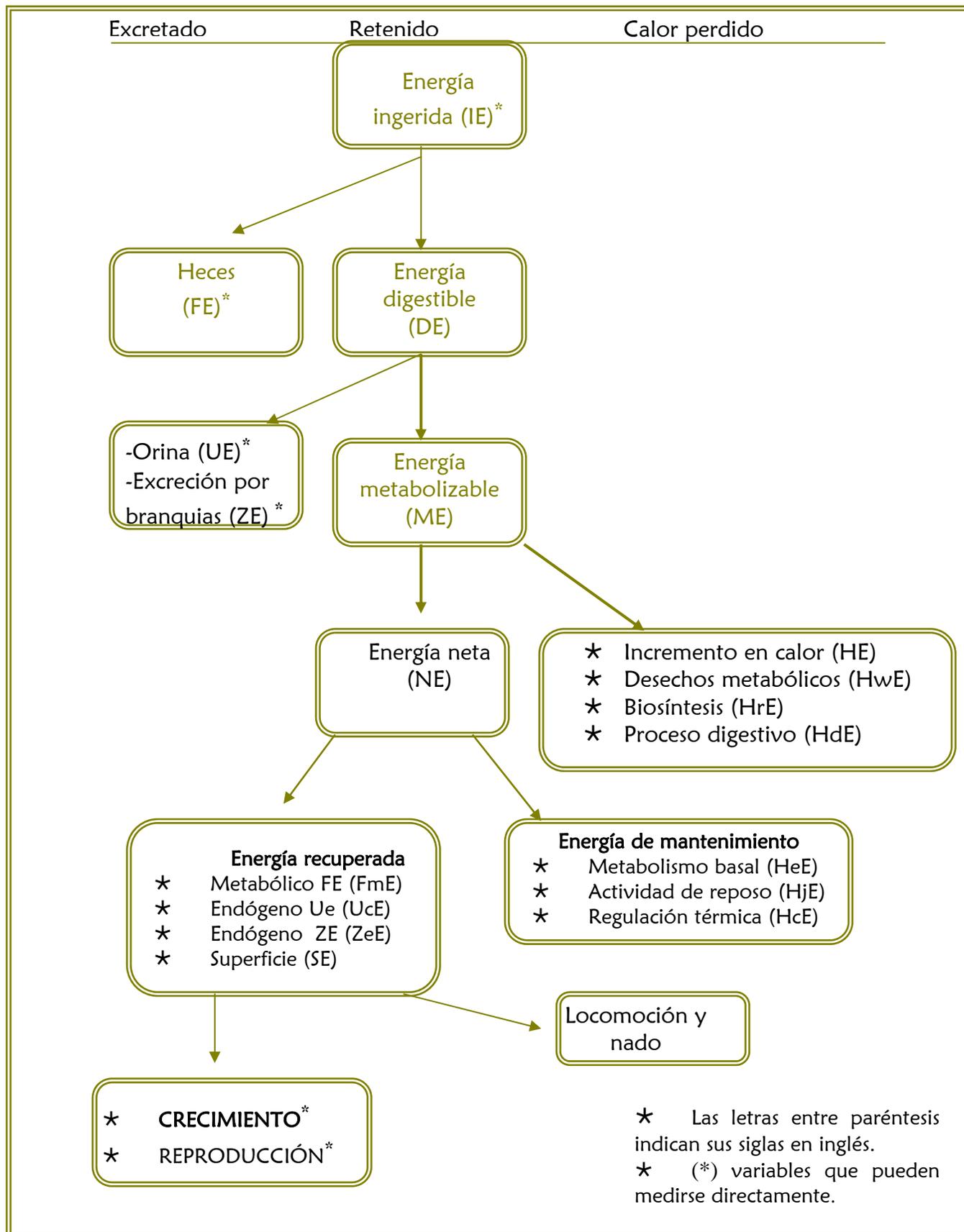


Figura 4. Modelo diagramático de la bioenergética individual desarrollado para peces (Cho *et al.* 1982).

Mishra (2002) considera que desarrollar un modelo bioenergético del crecimiento en camarones es un primer paso para generar un modelo de crecimiento para los mismos.

El conocimiento de la bioenergética en el crecimiento del camarón cultivado será resultado necesariamente de trabajo experimental. Sin embargo las unidades experimentales son específicas, caras y el investigador tiene que decidir probar pocos tratamientos con el número requerido de repeticiones y el efecto de pocos factores se puede medir en cada experimento. Integrando resultados de varios experimentos dentro de un modelo general se puede desarrollar un marco que ayude a comparar experimentos de diferente duración o con diferentes entradas que generen una mejor comprensión en problemas relacionados al crecimiento individual de los organismos y en problemas relacionados a un excesivo enriquecimiento y eutrofización de las aguas costeras como resultado del cultivo de camarón.

En este escenario se ha planteado la generación de un modelo de crecimiento individual de camarones peneidos específicamente para *Litopenaeus vannamei* diseñado a partir de los pasos para construir modelos definidos por Piedrahita (1988) y Chiappa-Carrara y Sanvicente-Añorve (1998): 1) Planteamiento del modelo conceptual; 2) Formulación de las ecuaciones del modelo; 3) Estimación de los valores de los parámetros; 4) Implementación del modelo computarizado; 5) Calibración y análisis de sensibilidad y 6) Validación del modelo.

Conceptualmente, el modelo está estructurado en cinco sub-modelos (o módulos de programación) que están interrelacionados (Figura 5): 1) Módulo de muda, 2) módulo de consumo de alimento, 3) módulo de digestión y biosíntesis de proteína, 4) módulo de metabolismo de la energía y 5) módulo de crecimiento.

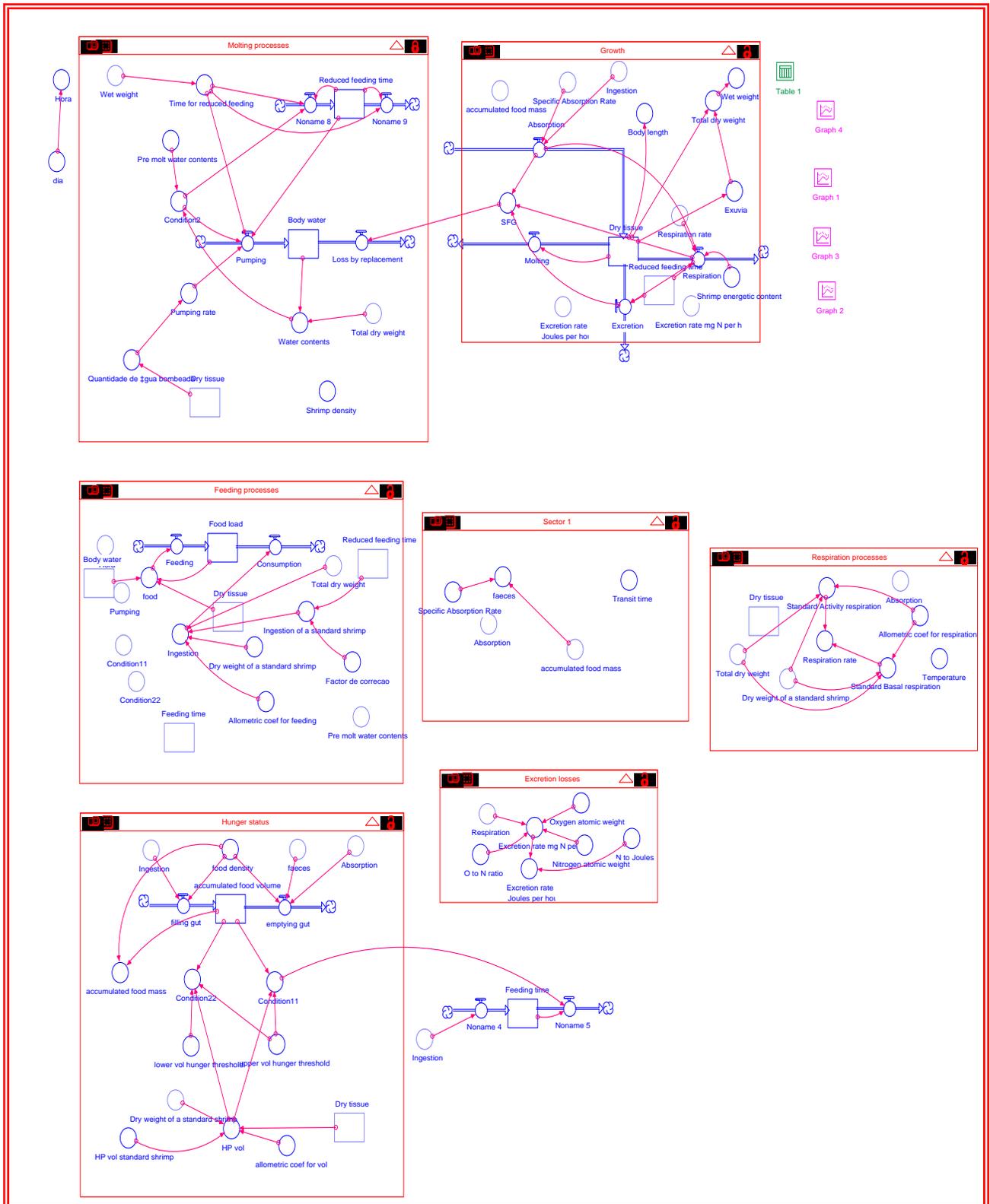


Figura 5. Diagrama conceptual del modelo dinámico de crecimiento de camarones peneidos.

El crecimiento de los camarones peneidos y de los organismos en general es el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales y nutricionales (Martínez, 1999).

El alimento y los costos de alimentación constituyen los gastos de operación más altos de las compañías de acuicultura (FAO, 1997), debido a ello la nutrición en el cultivo de camarón ha llegado a ser uno de los componentes más importantes en la investigación dentro del desarrollo de la acuicultura. Existen numerosos estudios realizados hasta ahora en el área de la alimentación algunos de los cuales se han enfocado a buscar sustitutos del alimento natural para disminuir los costos de producción o para disminuir los efectos de contaminación por efectos de cultivo (Rosas *et al.*, 2000). Otros trabajos incluyen investigaciones para conocer los requerimientos nutricionales para la producción masiva de larvas de *Litopenaeus vannamei* y *Litopenaeus setiferus* (Gaxiola *et al.*, 2002); también se han realizado estudios sobre los cambios de las necesidades nutricionales de las larvas de camarón blanco con la edad, incluyendo las concentraciones de alimento microparticulado, así como también las condiciones de oxígeno y salinidad necesarias para obtener animales de alta calidad (Rosas *et al.*, 2002a)

En particular, el crecimiento de los peneidos es fuertemente afectado por el contenido de proteína de la dieta, incluyendo aspectos relacionados con la composición proximal del alimento como de la calidad nutricional de cada componente. Dado que el problema se centra tanto en aspectos cuantitativos como cualitativos, uno de los principales retos actuales de la investigación en esta área es la comparación de la utilización de varias fuentes de proteína. Esto involucra el análisis de digestión y el crecimiento de los camarones alimentados con diferentes dietas conteniendo diferentes niveles y fuentes de proteínas.

En la última década se han realizado numerosos trabajos tendientes a profundizar en el conocimiento de la fisiología digestiva de las especies, los requerimientos de la especie, la aportación nutrimental del alimento natural, composición cualitativa y cuantitativa de ingredientes convencionales y alternativos para la elaboración de alimentos balanceados, así como de métodos de procesamiento,

estrategias y frecuencias de alimentación con el fin de optimizar la nutrición del organismo en cultivo (Martínez, 1999).

Para que el cultivo sea redituable es necesario, como se ha mencionado anteriormente, llevar a cabo investigaciones que permitan obtener mejores rendimientos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos que se han realizado, no es posible encontrar en la literatura respuestas a cuestiones como cuáles son los factores biológicos que determinan la interrelación entre la tasa de crecimiento y el conjunto de procesos relacionados con la alimentación de los organismos cultivados.

La alimentación está directamente relacionada con las tasas de ingestión, que son afectadas por una gran cantidad de factores internos, tales como el tamaño corporal y el volumen del tracto digestivo y por factores externos, como el fotoperíodo, la cantidad de oxígeno disuelto y la temperatura (Cruz-Suárez, 1999).

Una parte importante dentro de las investigaciones para determinar las tasas de ingestión es encontrar un indicador de saciedad. Los trabajos realizados hasta el momento proponen medir el tiempo de llenado del tracto digestivo (Nunes y Parson, 2000). Sin embargo los resultados obtenidos mostraron que el llenado del tracto digestivo no está relacionado con el reinicio de la ingestión. Al-Mohanna y Nott (1987) investigaron el ciclo digestivo y concluyeron que este proceso está regido por el hepatopáncreas debido a que es ahí en donde se lleva a cabo la mayor parte de este ciclo. A pesar de estos esfuerzos aún no es posible encontrar información sobre alguna estructura que explique en función de su tamaño cuando un organismo se ha saciado y por lo tanto no necesita tener disponible más alimento.

Otro de los factores que está relacionado con las tasas de ingestión, digestión y crecimiento es la temperatura y a pesar de ello pocos son los trabajos que se han realizado para explicar la magnitud del efecto de este factor sobre dichos procesos.

La temperatura y la salinidad del agua son los factores más importantes que afectan la vida de los camarones peneidos. En el hábitat natural la temperatura es un factor importante que influencia la abundancia y distribución de muchos organismos acuáticos (Croll y Watts, 2004). En los sistemas de producción se ha mostrado que la

temperatura es el factor principal que determina diferencias en la producción estacional (Teichert-Coddington *et al.*, 1994). Así, los efectos de la temperatura en el crecimiento de los camarones tienen repercusiones económicas importantes (Wyban *et al.*, 1995).

El objetivo de este trabajo es explicar cómo se comporta el crecimiento individual de los camarones con respecto a la temperatura desde un punto de vista energético analizado con relación a las tasas de digestión y absorción del alimento, considerando las entradas y las salidas de energía en el individuo así como la inversión de energía neta destinada al crecimiento. Así mismo se estudian las posibilidades de utilizar el volumen de llenado del tracto digestivo como un indicador de saciedad del camarón y relacionarlo con la tasas de ingestión.

Así, el módulo de alimentación (Figura, 6) quedará integrado al modelo general presentado anteriormente. Los resultados de este trabajo se integrarán al desarrollo de un modelo matemático que pueda ser utilizado en la industria camaronícola para estimar el crecimiento poblacional en estanques de cultivo.

El modelo general de crecimiento fue desarrollado en un programa de simulación por computadora denominado STELLA que proporciona un marco de referencia y una interfase gráfica de usuario para la observación e interacción cuantitativa de las variables de un sistema (Leslie, 1997).

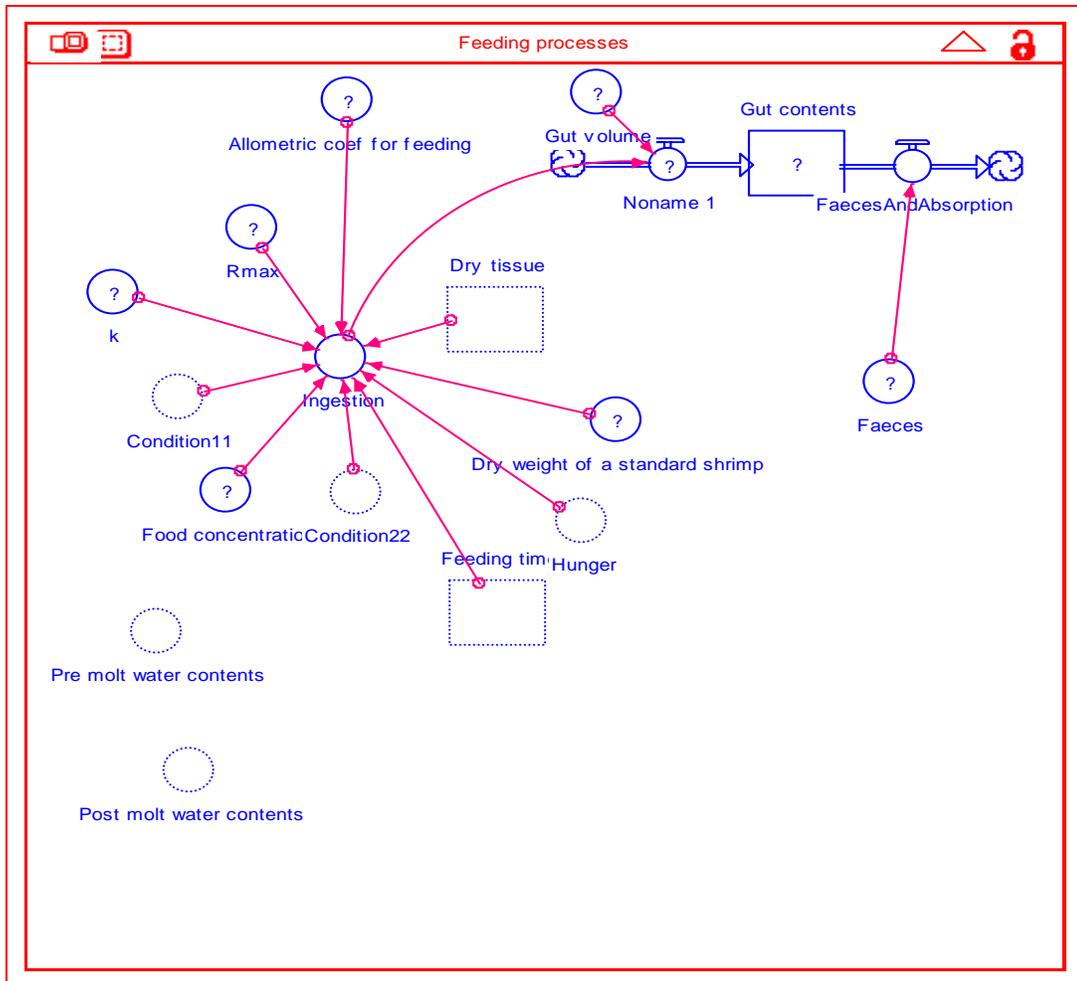


Figura 6. Sub-modelo de alimentación del modelo general de crecimiento de camarones peneidos.

El módulo de alimentación tendrá que simular cuál es la cantidad de alimento ingerido, qué cantidad es asimilada y qué cantidad es liberada al medio como heces para poder representar todo el proceso finalmente en una ganancia en peso y crecimiento individual. Por esta razón es necesario obtener los valores de las tasas de ingestión y asimilación en función del porcentaje de llenado del tracto digestivo, concentración de alimento y tipo de alimento.

3.2 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA DIGESTIVO DE CAMARONES PENEIDOS

El tracto digestivo de los crustáceos (Figura, 7) es una estructura compleja y con un número de características particulares (Lovett y Felder, 1989, Icely y Nott, 1992; Ceccaldi, 1997), es esencialmente un tubo interno abierto anteriormente a las partes bucales y posteriormente al ano. Está dividido en tres partes principales: esófago e intestino anterior, intestino medio y posterior (Dall y Moriarty; 1983, Felgenhauer, 1992).

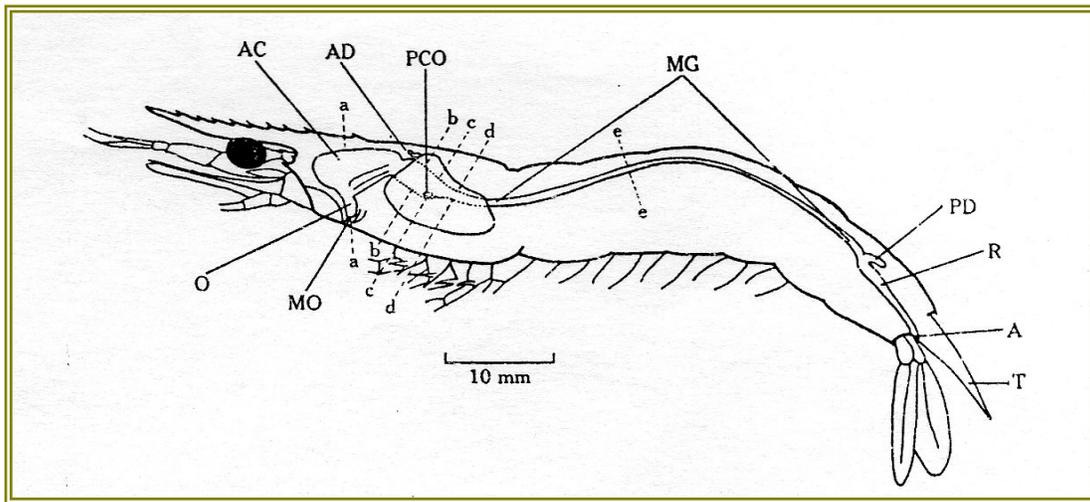


Figura. 7. Disección lateral del tracto digestivo. AC, cámara anterior del proventrículo; AD, divertículo anterior; PCO, apertura a la cámara posterior del proventrículo hacia la glándula digestiva; MG, Intestino medio; PD, Divertículo posterior; R, recto; A, ano; MO, boca; O, esófago. (Reproducido de Dall, 1967).

El intestino anterior normalmente ocupa la mitad anterior del cefalotórax es una cámara dual, un saco quitinoso que varía ampliamente en los decápodos, la cámara anterior, la cámara cardíaca (Figura 8) es un saco espacioso con una variedad de estructuras internas que facilitan la clasificación y masticación del alimento ingerido. Las cámaras están separadas por una válvula, llamada *válvula cardiopilórica*. La cámara pilórica (Figura 9 a y b) está dividida en una porción superior que conduce directamente al intestino medio y la región ventral que conduce a un dispositivo que filtra, llamada glándula filtradora o ampolla, la cual permite el paso solamente de partículas finas para entrar en la glándula digestiva. La cámara cardíaca y la cámara pilórica están compuestas de un número variable de placas quitinosas u osículos diferentes en tamaño y morfología, los osículos están conectados a otros por ligamentos membranosos

permitiendo así movimientos por la musculatura extrínseca que controla la acción del intestino anterior (Icel y Nott, 1992; Felgenhauer, 1992).

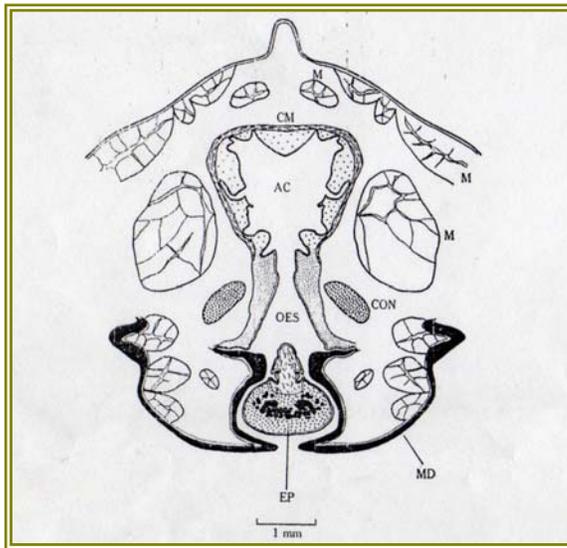
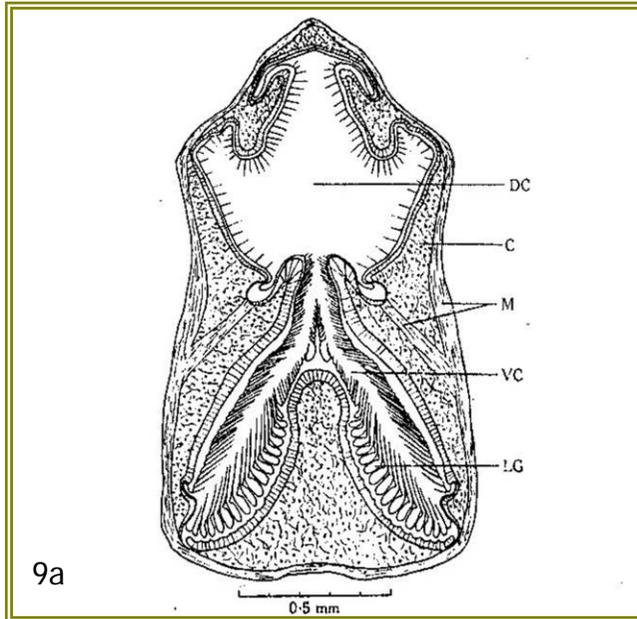


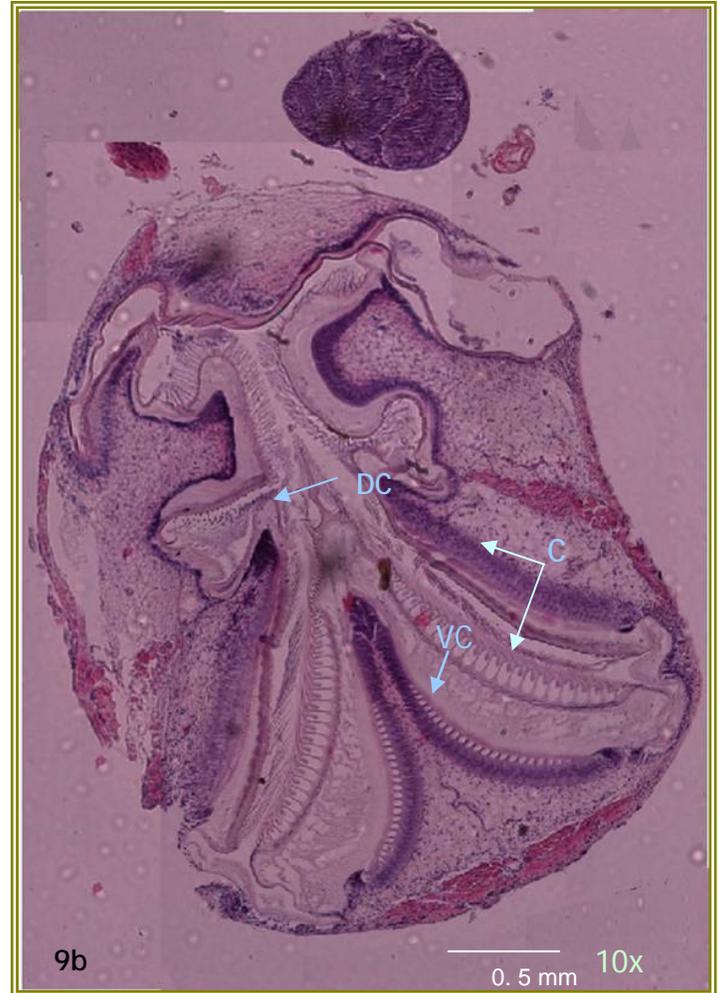
Figura 8. Corte transversal de la cámara anterior del proventrículo a través del esófago. M: músculos; AC: cámara anterior; OES, lumen del esófago. EP: epistoma, conteniendo glándulas. (Reproducido de Dall, 1967).

El esófago es un tubo simple que se extiende dorsalmente de la boca al estómago, usualmente corto, recto y ubicado verticalmente uniéndose a la boca del estómago (Icel y Nott, 1992; Ceccaldi, 1997). Longitudinalmente se pliega en las paredes alojando la expansión del lumen cuando el alimento es transferido de la boca al estómago. Por debajo del epitelio esofágico, las glándulas son embebidas en el tejido conectivo, estas glándulas probablemente sintetizan y producen mucus para lubricar el paso del material ingerido a través del intestino (Icel y Nott, 1992).

El intestino anterior está diseñado para que realice las fases tempranas del ciclo digestivo, las cuales involucran: el rompimiento físico del material ingerido, rompimiento químico por medio de enzimas digestivas, la separación de partículas finas y fluidos a partir de un material grueso por medio de filtros, el transporte de partículas finas y fluidos para un tratamiento adicional en el hepatopáncreas y transporte de material grueso vía intestino para una eventual defecación en el intestino posterior (Icel y Nott, 1992).



Figuras 9a y 9b. Sección transversal a través de la cámara posterior del proventrículo. DC: compartimento dorsal; C: tejido conectivo; M: músculo; VC: compartimento ventral. (Reproducido de Dall, 1967).



El intestino medio (Figura 10) abarca desde la sección posterior del compartimento pilórico hasta la porción posterior del hepatopáncreas, se extiende como un *tubo* desde la mitad posterior del cefalotórax al intestino posterior dentro del abdomen (Icely y Nott, 1992). La pared del intestino medio está definida histológicamente como un epitelio simple glandular, excepto por una muy delgada capa de tejido conectivo y fibras musculares, esta simple capa de células está en contacto directo internamente con la sangre, permitiendo la absorción de nutrientes para ser rápidamente transportados (Dall y Moriarty, 1983). Ésta estructura está diseñada para realizar las fases tardías del ciclo digestivo: 1) completar el rompimiento de los productos digestivos recibidos del intestino anterior, 2) producir y suministrar enzimas digestivas al intestino anterior, 3) absorber y procesar los productos digestivos por transportación en la sangre o por almacenamiento dentro del intestino medio y 4)

remover los materiales residuales como heces, y producir la membrana peritrófica (Figura 11) que envuelve la materia fecal.

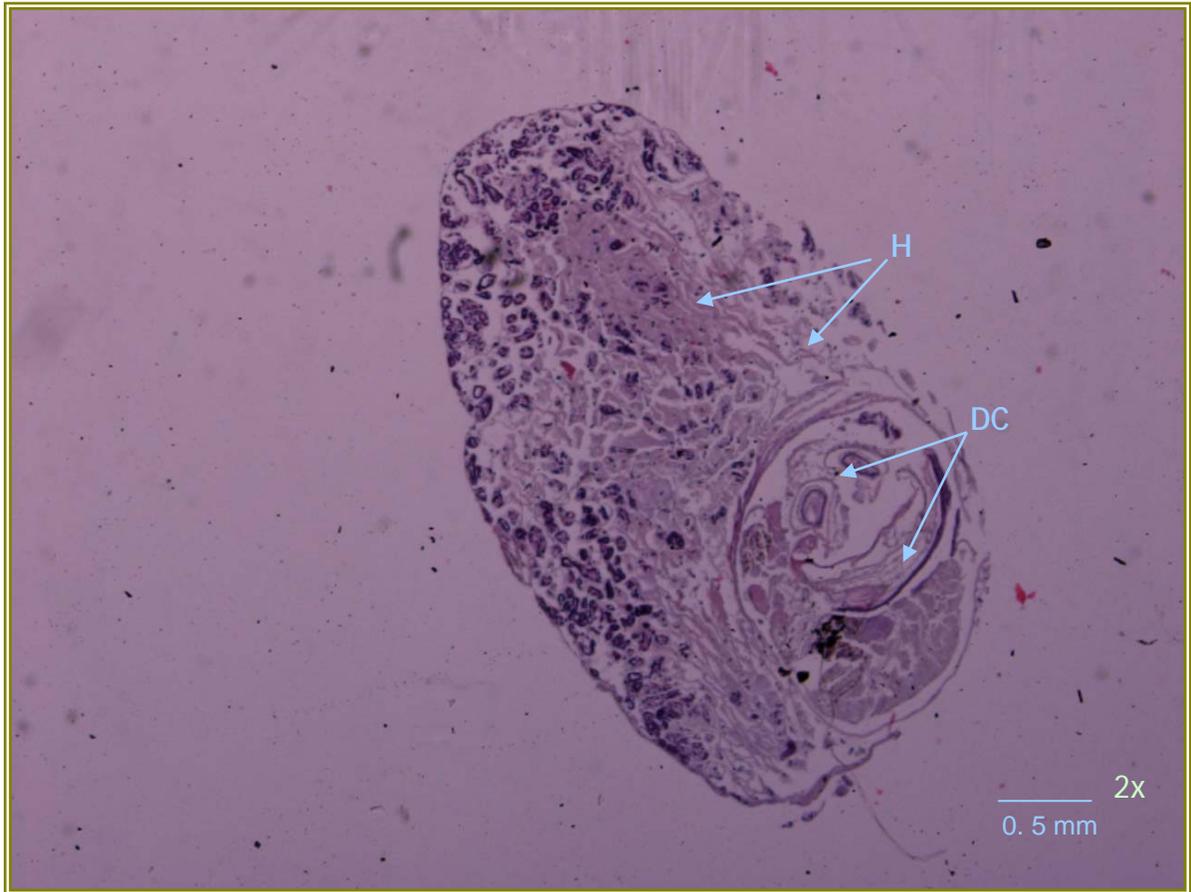


Figura 10. Corte histológico que muestra la estructura del intestino medio. H: Hepatopáncreas; DC: parte final de la cámara posterior del proventrículo.

Así mismo, el intestino medio está involucrado en otros procesos, tales como el mantenimiento de sales y el balance iónico, vitelogénesis, juega un papel inmunológico en la eliminación de cuerpos extraños del sistema sanguíneo, la eliminación de metabolitos de desecho del sistema sanguíneo desintoxicación de metales y otras sustancias orgánicas extrañas (Icely y Nott, 1992).



Figura 11. Corte histológico transversal que muestra la estructura del intestino medio. PM: Membrana peritrófica conteniendo heces; CE: epitelio columnar; M: músculo.

El hepatopáncreas o bien glándula del intestino medio, está compuesta principalmente de túbulos del ciego en donde se sitúan las enzimas digestivas (Ceccaldi, 1997). Es un órgano compacto que ocupa una gran parte de la cavidad cefálica posterior a la cavidad cardíaca del estómago. Tiene dos lóbulos separados los cuales están compuestos por hileras de túbulos ciegos que vierten por el extremo abierto, sus productos de secreción al estómago. Cada lóbulo está conectado ventralmente con el tubo digestivo en la unión del estómago pilórico y la parte anterior del intestino. Las

paredes de los túbulos están constituidas por células de varios tipos: células de absorción y de acumulación, células secretoras, embrionarias, y fibrilares (Cruz-Suárez, 1999).

Las células embrionarias (E), son células pequeñas que se encuentran en el final de los ciegos de los túbulos, se diferencian en los diferentes tipos de células, tales como las células secretoras o células B, las cuales tienen un borde estriado y presentan diversos mecanismos de secreción. Las células R o de absorción, son células columnares y son caracterizadas por un borde plumoso, tiene un amplio número de vesículas de almacenamiento, captan los nutrientes presentes en los túbulos y sintetizan glucógeno y lípidos., adicionalmente, secuestran depósitos de minerales tales como el calcio, magnesio, fósforo y azufre.

Las células C o células *ampolla* son grandes, primariamente células secretoras que son definidas por la presencia de una única vesícula rodeada por un citoplasma denso conteniendo RER, éstas células son productoras de enzimas digestivas en el hepatopáncreas.

Las células fibrilares (F) tienen un núcleo localizado basalmente y un retículo endoplásmico rugoso (RER) muy desarrollado, dando una apariencia fibrilar. Sintetizan las enzimas digestivas y las guardan en una vacuola supranuclear. La vacuola supranuclear se agranda por pinocitosis capturando nutrientes de la luz del túbulo hasta originar una célula B típica. El mecanismo de vertido de enzimas no es bien conocido, pero se considera que hay una digestión intracelular y otra extracelular que se lleva a cabo en el lumen de los túbulos del hepatopáncreas (Cruz-Suárez, 1999).

Este órgano tiene funciones importantes en la absorción, transporte, secreción de enzimas digestivas y almacenamiento de lípidos, glucógeno y minerales (Felgenhauer, 1992).

Se ha propuesto que las principales funciones digestivas y de absorción del hepatopáncreas se llevan a cabo por las células B, evidencias microscópicas sugieren que las células B ingieren nutrimentos por endocitosis en una vacuola digestiva (Al-Mohanna y Nott, 1986).

El hepatopáncreas de los peneidos ha mostrado ser un sitio de síntesis para la hemocianina y enzimas digestivas (Gibson y Barker, 1979), Lehnert y Johnson (2002) demostraron que la síntesis de hemocianina se presenta en las células F.

El intestino posterior transporta desperdicios residuales del intestino anterior y medio hacia el exterior. Es un tubo simple, casi liso, cuticular que conecta al lumen en el extremo posterior del intestino con el ano que abre dentro de la superficie del exoesqueleto por debajo del telson (Icely y Nott, 1992; Ceccaldi, 1997).

Morfológicamente está adaptado para soportar cambios importantes en volumen y la contracción vigorosa de la defecación, la cual es ayudada por movimientos antiperistálticos que bombean agua dentro del intestino posterior (Icely y Nott, 1992).

El intestino posterior normalmente ocupa solamente la parte abdominal final (Icely y Nott, 1992), es derivado del ectodermo y la característica más importante es la presencia de escamas cuticulares. Estas modificaciones cuticulares siempre dirigen sus espinas en dirección del ano y posiblemente ayudan en el movimiento de la masa fecal hacia el ano.

3.3 DIGESTIÓN

La descripción de la morfología funcional del sistema digestivo de los decápodos se ha concentrado principalmente en la descripción de los movimientos de las partículas de alimento (Figura 12).

Se ha propuesto, con base en la morfología del tracto digestivo que una vez que el alimento entra a la cámara anterior del proventrículo este se mezcla con los fluidos provenientes de la glándula digestiva que fluyen hacia delante en el surco en la cámara posterior (Dall y Moriarty, 1983).

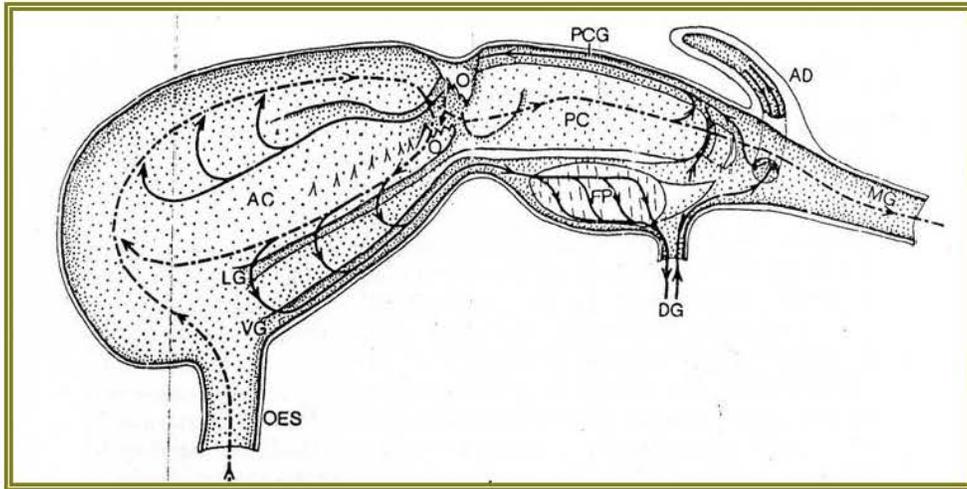


Figura 12. Diagrama hipotético generalizado de la circulación de los productos de la glándula digestiva. Líneas en punto, vía de alimento sólido; líneas sólidas, vía de fluidos; AC: cámara anterior; DG, abertura de la glándula digestiva; FP, filtro prensa; LG, surcos laterales; MG, intestino medio; O, oscículos del molino gástrico; OES, esófago; PC, cámara posterior; PCG, surcos dorsolaterales de la cámara posterior; VG, surcos ventrales. Reproducido de Dall y Moriarty, 1983.

La trituración y la mezcla posterior con los fluidos ocurren en los oscículos del molino gástrico. La masa de alimento es manipulada continuamente por las placas (dientes) laterales de la cámara anterior y es forzada hacia el molino gástrico. Eventualmente los fluidos pasan de la masa de alimento hacia el surco ventral de la cámara anterior.

Después de pasar por el molino gástrico el alimento es tamizado por un *filtro prensa*, el cual permite solamente el paso de fluidos y partículas finas para entrar a la glándula digestiva para la digestión final y la absorción (Dall y Moriarty, 1983).

4. HIPÓTESIS

El crecimiento somático (C) de *Litopenaeus vannamei* se puede representar como una función directa de las tasas de ingestión (I) y absorción del alimento (A). Por un lado, dichas tasas son dependientes de la temperatura, por lo que debe existir un intervalo relativamente estrecho de este parámetro en el que se maximicen las tasas (alrededor de 29 °C), que tenderán a disminuir al alejarse de ese valor de temperatura. Por el otro, el llenado del tracto digestivo es otra variable que modifica de manera importante las tasas de ingestión del alimento pero actúa de forma inversa.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

 Estimar los parámetros del crecimiento individual para integrarlos a un modelo dinámico de camarones, como función de las tasas de ingestión y absorción de alimentos en respuesta a diferente temperaturas (una óptima, 29 °C y dos situadas a los extremos de la óptima 26 y 32°C) y llenado del tracto digestivo en juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

 Estimar las tasas de ingestión (I) y absorción (A) del alimento en tres condiciones de temperatura.

 Estimar el crecimiento individual en biomasa respecto al tiempo.

 Estimar el volumen del tracto digestivo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. TASAS DE CRECIMIENTO, INGESTIÓN Y ABSORCIÓN.

6.1.1 OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ORGANISMOS.

Los organismos que se utilizaron para evaluar las tasas de crecimiento, alimentación y absorción se obtuvieron de un desove inducido en el laboratorio de reproducción de camarón de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Sisal Yucatán.

Para llevar a cabo el experimento se seleccionaron 300 organismos de 20 mm de longitud total. Los cuales se mantuvieron en tres tinas para su aclimatación durante un período de 10 días (Sánchez *et al.*, 2001), en las condiciones de temperatura a evaluar, aireación y flujo de mar (35 UPS) constantes.

6.1.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar la variación de respuesta de las tasas de ingestión, absorción y crecimiento en función a la temperatura se examinaron 3 temperaturas: 26 y 32° C, que de acuerdo a Fenucci (1988) son los extremos del intervalo de temperatura óptima de crecimiento y el valor medio óptimo que es 29° C.

Para llevar a cabo los experimentos se diseñó un sistema de recirculación abierto (Figura 13) que consistió en una serie de quince acuarios de 56 cm de largo x 31.5 de ancho y una altura de 30 cm, con 12 divisiones. El agua llega a los acuarios por medio de un sistema hidráulico conectado a dos tanques, uno habilitado con calentadores sumergibles de vidrio (Aqua-kriil) y de titanio (Aquatic Ecosystem, Inc. Mod. NS25); y el otro con un enfriador (AZOO) respectivamente. Los tanques de alimentación estuvieron provistos de hule espuma y geomembrana como aislante térmico para evitar cambios en la temperatura del agua. Así mismo, las paredes de los acuarios fueron protegidas con placas de poliuretano (unicel), y la parte superior se cubrió con una tira de poliburbujas para mantener las temperaturas experimentales (Figura 14).

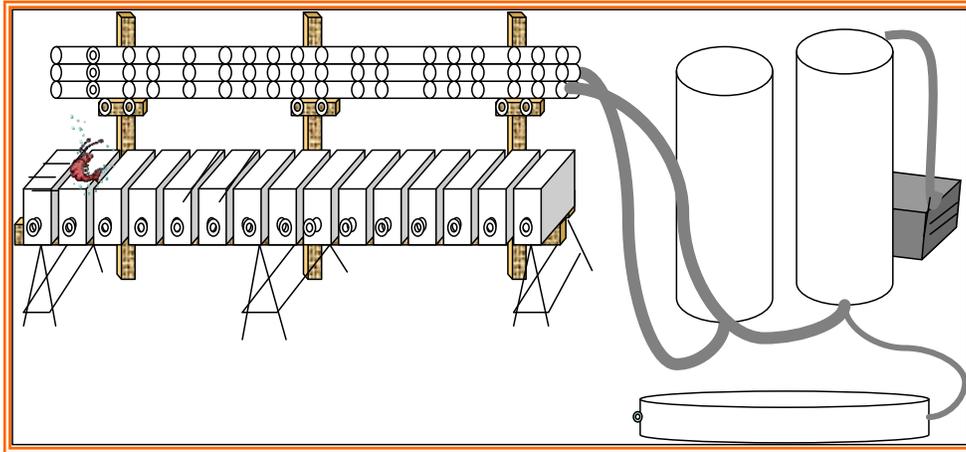


Figura 13. Diagrama del sistema diseñado para estimar las variaciones de respuesta de crecimiento debidas a la temperatura.

Para cada temperatura se utilizaron cinco acuarios. Las temperaturas extremas del intervalo se obtuvieron directamente de los tanques que alimentaron el sistema y la temperatura óptima se consiguió mezclando agua de ambos tanques. El flujo del agua y la aireación convergieron en una de las divisiones del acuario que no tenía organismo para que estos no influyeran en la respuesta de los mismos. El dispositivo estuvo en funcionamiento durante siete días antes de iniciar el experimento para asegurar que las condiciones arriba mencionadas se mantuvieran por periodos largos.

Una vez transcurrido el tiempo de aclimatación se colocaron aleatoriamente a 165 organismos de *Litopenaeus vannamei* individualmente en los acuarios, para cada temperatura se colocaron 55 organismos (Figura 15). Se registraron medidas morfométricas y ponderales de cada uno de ellos. La longitud se midió con un vernier Foy® y el peso con una balanza analítica Sartorius® ± 0.1 mg.

La temperatura del agua se monitoreó constantemente para hacer los ajustes en caso de que hubiera algún cambio en ésta.



Figura 14. Sistema experimental.



Figura 15. Disposición de los organismos en los acuarios experimentales.

Para que la única fuente de variación en las tasas de ingestión y absorción fuera la temperatura, el alimento que se les proporcionó a los camarones (dieta animal al 40% de proteína) fue el que ha tenido mayores rendimientos en el crecimiento (Rosas y Sánchez, 1996) y se preparó de acuerdo a la formulación realizada por Gaxiola (ANEXO I).

6.1.3 TASAS DE INGESTIÓN Y ABSORCIÓN.

Los organismos se alimentaron al 20% de su biomasa repartido en dos raciones al día: 9:00 y 18:00 h. Los camarones se pesaron y midieron semanalmente para recalcularse la ración de alimento.

El alimento suministrado se dejó por un período de 2 horas, al final del cual el alimento no consumido y las heces producidas se retiraron por medio de una manguera de 5 mm de diámetro interno, recuperándolos en un frasco para su separación.

Para separar las heces del alimento no consumido se utilizó una pipeta Pasteur, posteriormente se filtró cada fracción por medio de un embudo y papel filtro comercial de 8.5 cm de diámetro, previamente pesado. Las muestras se lavaron con agua destilada para eliminar la mayor cantidad de sales posibles.

Los filtros con las muestras de heces y alimento no ingerido fueron colocados 48 horas en un horno a 60° C para obtener el peso seco de cada una de ellas.

Con estos datos se calculó la cantidad de alimento ingerido por cada individuo a partir de la siguiente expresión:

$$A_i = A_o - A_1$$

Donde A_i = peso seco (g) del alimento ingerido; A_o = peso seco (g) del alimento ofrecido; A_1 = peso seco (g) del alimento recuperado del acuario.

Las tasas de absorción se calcularon a partir de la siguiente expresión:

$$A_a = (A_o - A_1) - A_f$$

Donde A_a = Alimento absorbido; A_o = peso seco (g) del alimento ofrecido; A_1 = peso seco (g) del alimento recuperado del acuario y A_f = peso seco (g) de las heces.

El cálculo de las tasas de ingestión y absorción se realizó cinco veces a la semana a una submuestra de 10 organismos seleccionados completamente al azar. Así mismo, estas evaluaciones se realizaron para todos los organismos al final del experimento, para ello los organismos que iban muriendo se reemplazaron por otros que se mantuvieron en tinas de aclimatación en las mismas condiciones experimentales.

6.1.4 PRUEBA DE LIXIVIACIÓN.

Debido a las pérdidas que tiene el alimento al entrar en contacto con el agua, se realizó una prueba de lixiviación para corregir los datos obtenidos para las tasas de ingestión y absorción.

Para ello, en 10 matraces Erlenmeyer de 50 mL de capacidad se colocó una cantidad conocida del alimento utilizado en el experimento y se agregaron 30 mL de agua de mar. Los matraces se colocaron en un sistema de agitación mecánica, y se dejaron en éste durante un período de 2 horas al final del cual se sifoneó la fracción sedimentada de la misma manera que en el experimento. El alimento recuperado se filtró por medio de embudos y papel filtro comercial, previamente pesado. Las muestras se lavaron con agua destilada para eliminar las sales y se secaron en la estufa a 60°C

durante 48 horas. Finalmente cada uno de los papeles filtro se pesó y por diferencia de pesos se calculó la cantidad de alimento perdido debido al proceso de lixiviación.

6.1.5 TASAS DE CRECIMIENTO.

Para estimar el crecimiento de los organismos estos se pesaron y midieron semanalmente. El análisis de datos sólo se realizó con los organismos que sobrevivieron durante todo el experimento.

6.1.6 ANÁLISIS DE DATOS

Para conocer el efecto de la temperatura en las tasas de ingestión y absorción, el análisis de datos se hizo en dos partes: se realizó un ANOVA de una vía para cada uno de los grupos de datos obtenidos durante el transcurso experimental. Se aplicó un ANOVA anidado con un factor de variación (temperatura) y tres niveles (temperaturas a evaluar) para el grupo de datos obtenidos al final del experimento, el factor de anidamiento lo constituyeron los acuarios.

Para conocer la variación de las tasas de crecimiento con respecto a la temperatura se realizó un análisis de regresión con medidas repetidas.

6.2. VOLUMEN DEL TRACTO DIGESTIVO.

La estimación del volumen del tracto digestivo se hizo mediante aproximaciones geométricas a partir de cortes histológicos de esta estructura.

6.2.1. CORTES HISTOLÓGICOS.

Para obtener los tractos digestivos (TD), los organismos se disecaron mediante la técnica descrita por Arias (2007).

Los organismos se sacrificaron cortando el cordón nervioso situado en la parte ventral separando el cefalotórax y abdomen. La extracción del TD se realizó sujetando el abdomen y separando el exoesqueleto del músculo con un bisturí. Posteriormente con unas tijeras se cortó longitudinalmente el músculo exponiendo el TD que se extrajo con unas pinzas. Los tractos digestivos se fijaron en solución de Davidson (AFA, alcohol-formaldehído-ácido acético) hasta que fueron procesados histológicamente en el

Laboratorio de Ictiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida.

El proceso histológico (ANEXO II), consistió en deshidratación con alcoholes graduales, aclaración con clarene y la inclusión en parafina (Aguilar *et al.*, 1996 y Morales, 2004). La deshidratación se llevó a cabo en un histoquinete semiautomático; los tractos digestivos se sujetaron con hilo de algodón a las cajas en las que se realizó la deshidratación para que al final del proceso el órgano estuviera firme y recto y se asegurara que el corte se hiciera en la posición correcta.

Para formar los bloques, se utilizaron moldes de metal. Los bloques se cortaron en un micrótopo de rotación (American Optical Mod. 860) a un grosor de 15 μm . Del total de cortes obtenidos se seleccionaron secciones de acuerdo a la morfología del órgano, se tiñeron con Hematoxilina-eosina y se montaron en preparaciones permanentes con resina sintética (ANEXO II). Las preparaciones se observaron en un microscopio (Eclipse E600POL) y las fotografías se capturaron con una cámara digital Nikon (DS-L1).

6.2.2. MANEJO DE IMÁGENES PARA ESTIMAR EL VOLUMEN DEL TRACTO DIGESTIVO.

Cada una de las imágenes se capturó por triplicado, la primera imagen se midió con las herramientas de la cámara fotográfica, previamente calibrada con una cámara de Neubauer, la segunda fotografía se capturó sin medidas y la tercera fotografía se capturó a un aumento mayor (Figura 16a, 16b y 16c).

La primera fotografía se utilizó para conocer el tamaño de cada uno de los cortes histológicos, la segunda, para realizar todo el procesamiento de obtención de volumen y la tercera sirvió como apoyo para reconocer las estructuras del órgano. Se reconstruyeron con el software CorelDraw[®] aquellas imágenes que fue necesario capturar por secciones al ser observadas en el aumento de 10x.

De cada imagen se seleccionó primero la estructura del tracto digestivo, excluyendo la del hepatopáncreas y algún otro artefacto del corte histológico. Una vez que se había seleccionado la estructura, se procedió con las herramientas de color del

software GIMP® a “marcar” los espacios que, en el proceso alimentario, pueden ser ocupados por el alimento (Figura 16d). La imagen se transformó a escala de grises (Figura 16e) se desplegaron las herramientas de *umbral* e *histograma*, mediante las cuales se obtuvo la equivalencia de píxeles totales para cada fotografía y el número de píxeles equivalente al espacio utilizado por el alimento (Figura 16e-16i). Con estos datos se obtuvieron: 1) el volumen total del corte histológico y 2) el volumen real que es utilizado por el alimento.

A partir de la morfometría del corte histológico se calculó el volumen para cada uno de ellos, cada corte histológico se aproximó a una figura geométrica y considerando el grosor del corte histológico como la altura de cada figura se hizo el cálculo; el volumen total se obtuvo mediante la sumatoria del volumen de todos los cortes histológicos. Como medida de referencia, se obtuvo el volumen total del TD mediante el registro del desplazamiento de agua de esta estructura en una probeta de 10 mL graduada en 0.01 mL.

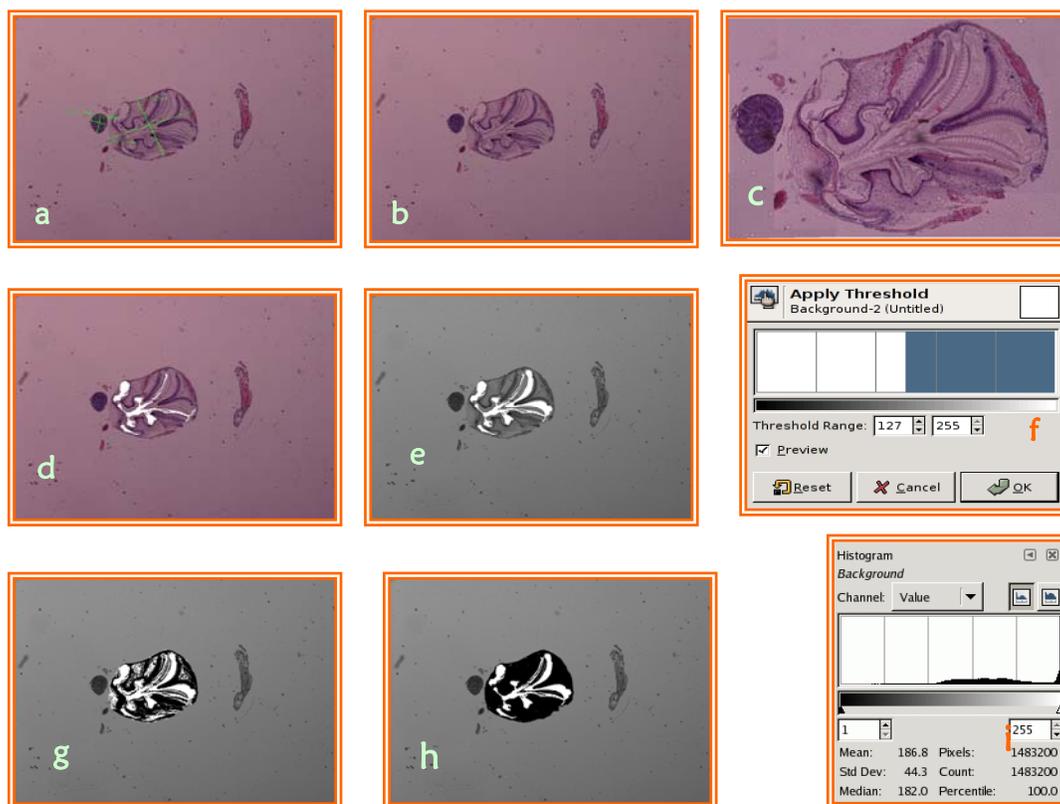


Figura 16. Procesamiento de las imágenes para calcular el volumen del tracto digestivo.

7. RESULTADOS

7.1. TASAS DE INGESTIÓN, ABSORCIÓN Y CRECIMIENTO.

7.1.1 SUPERVIVENCIA

El experimento para generar los parámetros de crecimiento individual de *L. vannamei* en respuesta a las tasas de ingestión y absorción a diferentes temperaturas duró un total de 59, 48 y 33 días para la primera (26°C), segunda (29°C) y tercera temperatura (32°C) respectivamente.

El índice de supervivencia semanal para cada una de las temperaturas (tabla 1) se mantuvo por arriba del 90%, a excepción de la última semana, en donde decayó drásticamente para la temperatura de 32°C.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia semanal para cada uno de los diferentes tratamientos.

TIEMPO (SEMANAS)	1	2	3	4	5	6	7	8
TEMPERATURA (°C)								
26	100	100	98.2	96.4	92.7	90.9	87.3	85.5
29			92.7	89.09	85.5	83.6	76.4	72.7
32				92.7	92.7	90.9	89.1	60

7.1.2 TEMPERATURA EN EL SISTEMA EXPERIMENTAL

Las condiciones experimentales de temperatura se mantuvieron como se muestra en la Figura 17. El promedio para el intervalo inferior se mantuvo en $26 \pm 0.5^\circ \text{C}$, la temperatura óptima se mantuvo en $29 \pm 0.9^\circ \text{C}$ y la temperatura del límite superior se mantuvo en $32 \pm 1^\circ \text{C}$.

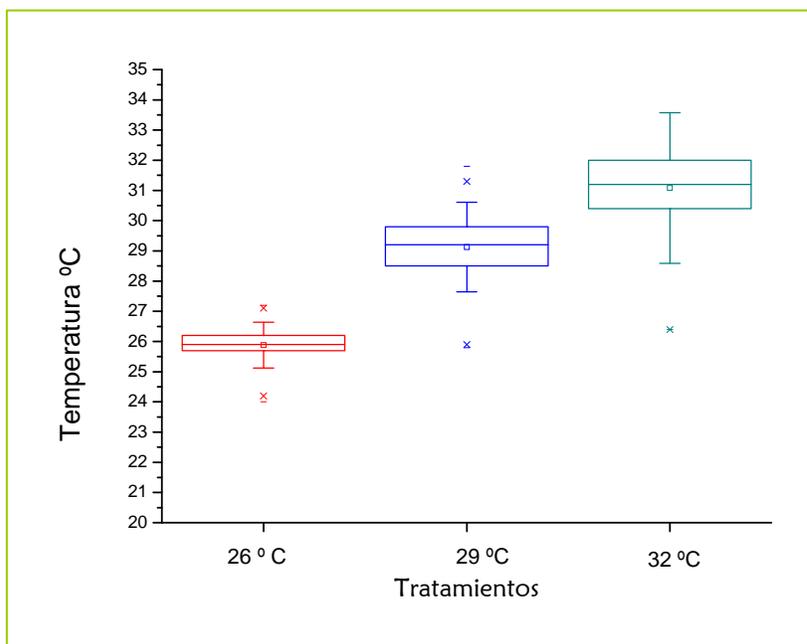


Figura 17. Variación de la temperatura en el sistema experimental.
□ Media \pm desviación estándar \pm ┆ intervalo de confianza al 95%

7.1.3 TASAS DE INGESTIÓN Y ABSORCIÓN.

La prueba de lixiviación para corregir los resultados de las tasas de ingestión mostró que las pérdidas de alimento debidas a este proceso representan el 37 % del total del alimento ofrecido a los organismos.

Para realizar el análisis estadístico a los resultados de tasas de ingestión y absorción calculadas para los organismos durante el tiempo que duró el experimento, los organismos fueron clasificados en dos grupos, uno constituido por aquéllos individuos que mudaron o que estaban próximos a presentar este evento, mientras que el otro estaba formado por aquéllos que estaban en intermuda en base a los datos proporcionados por Galindo (2007).

7.1.3.1 Organismos en Postmuda.

De acuerdo a los resultados obtenidos no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de alimento ingerido por los organismos en estadio de postmuda en respuesta a la temperatura ($p > 0.05$). Este mismo comportamiento se presenta para la cantidad de alimento absorbido (Figuras 18 y 19).

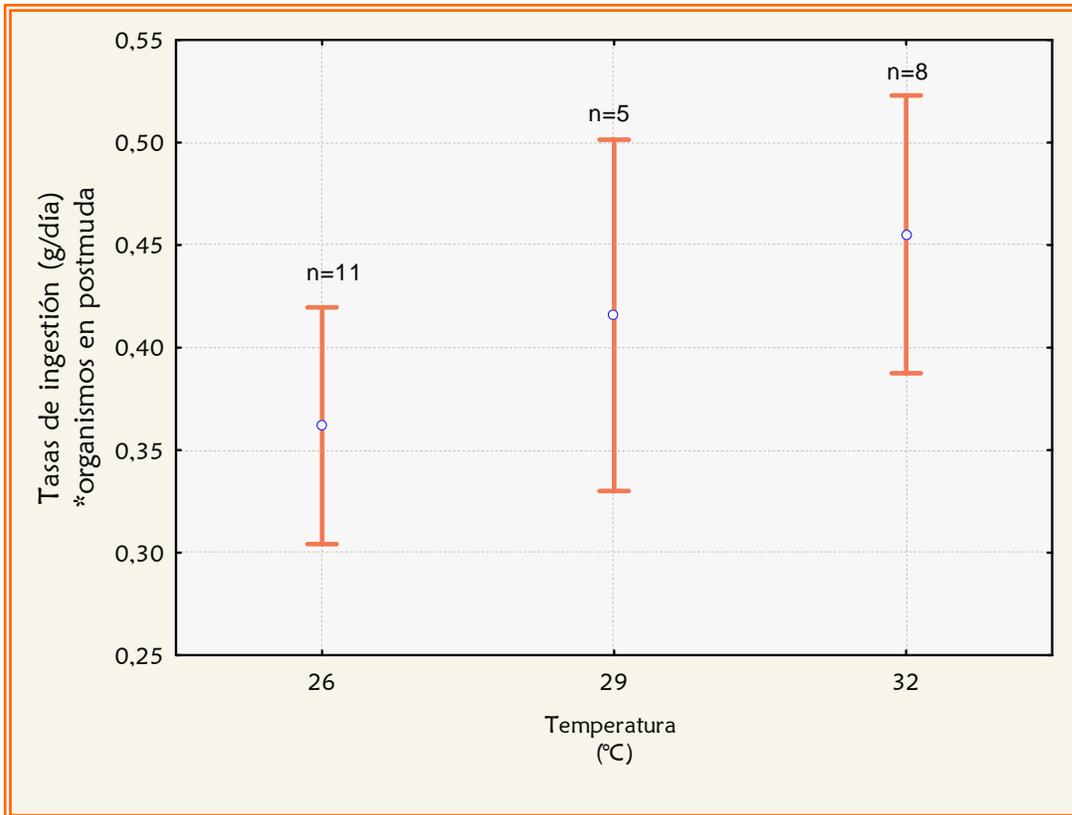


Figura 18. Relación entre la temperatura y las tasas de ingestión de alimento en organismos de *L. vannamei* durante la postmuda. El cuadro representa la media y las barras denotan el intervalo de confianza al 95%.

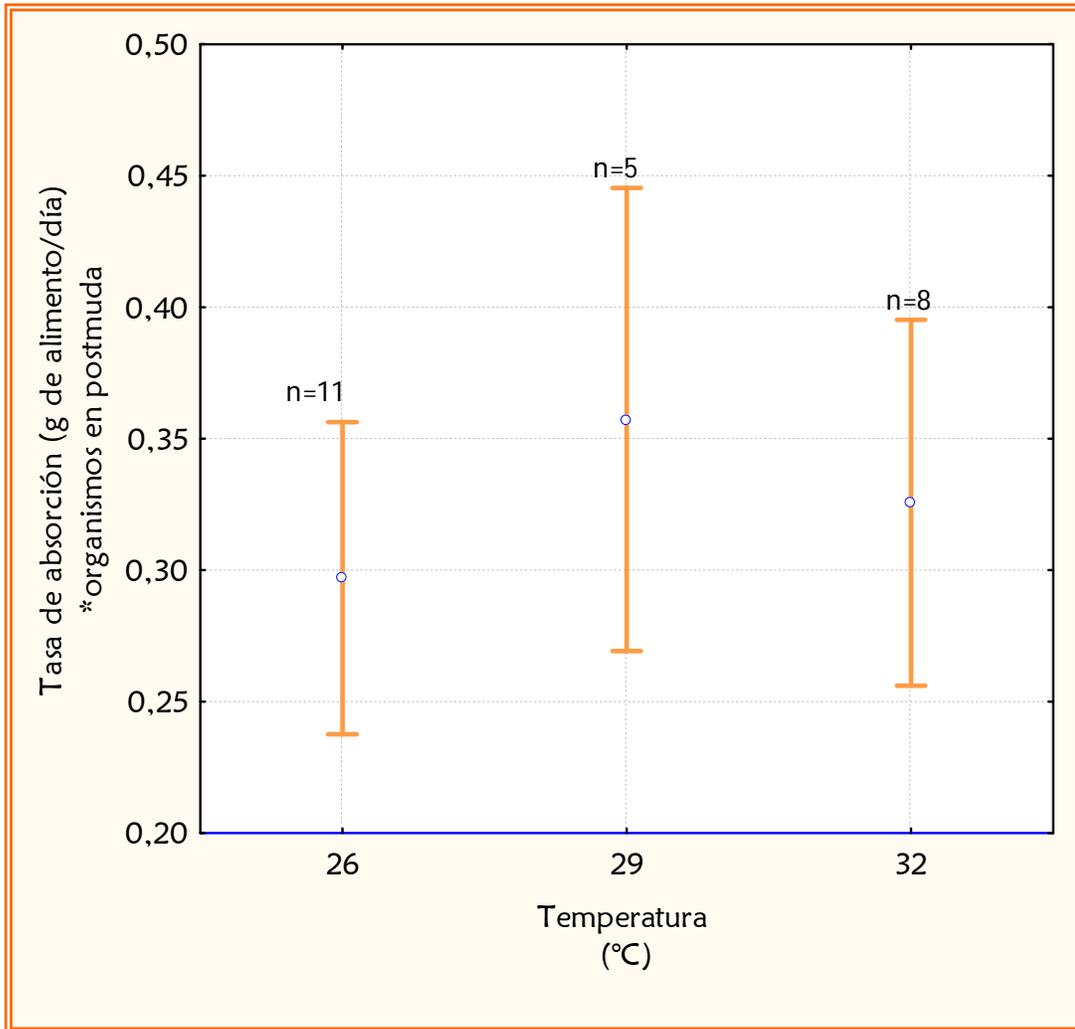


Figura 19. Relación entre la temperatura y las tasas de absorción de alimento en organismo de *L. vannamei* en postmuda. El cuadro representa la media y las barras denotan el intervalo de confianza al 95%.

7.1.3.2 Organismos en Intermuda.

Para el caso de los organismos que se encontraban en periodo de intermuda los resultados muestran que el efecto de la temperatura sobre las tasas de ingestión y absorción no es significativa ($p>0.05$), (Figuras 20 y 21).

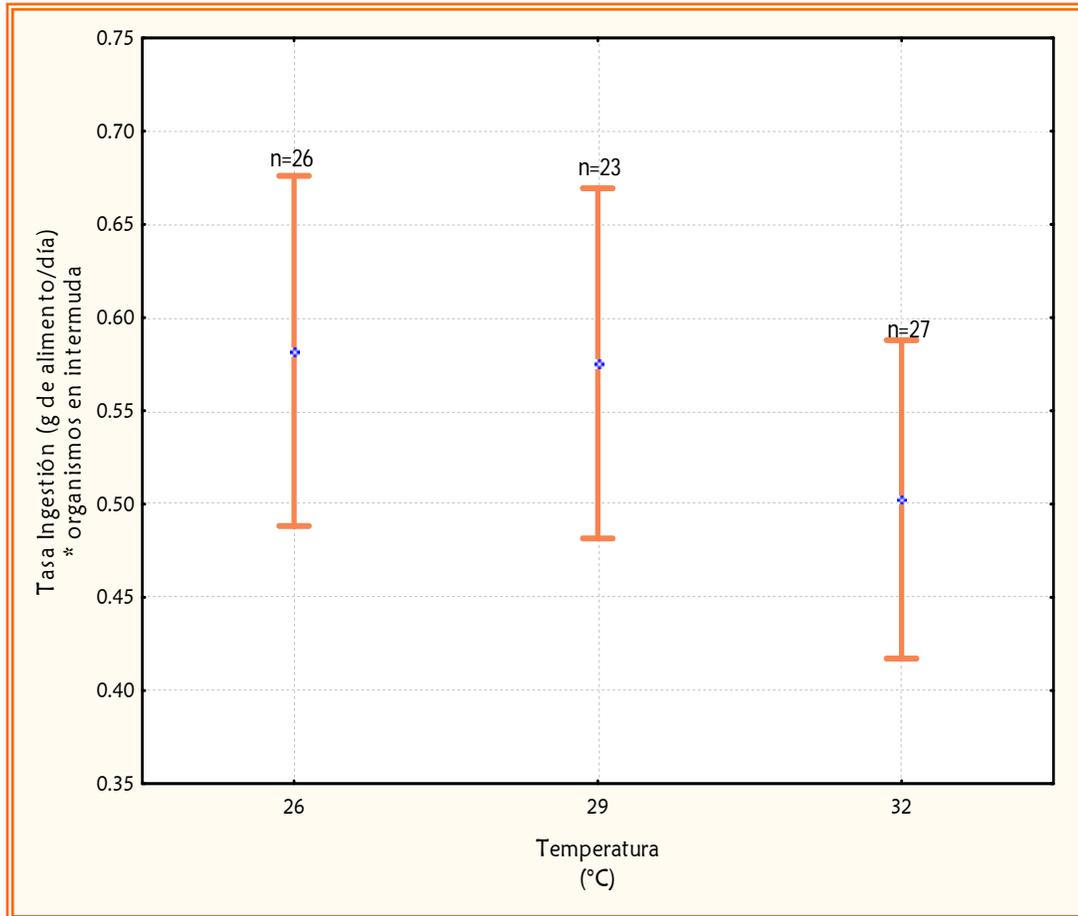


Figura 20. Relación entre la temperatura y las tasas de ingestión de alimento en organismos *L. vannamei* en período de intermuda. El cuadro representa la media y las barras denotan el intervalo de confianza al 95%.

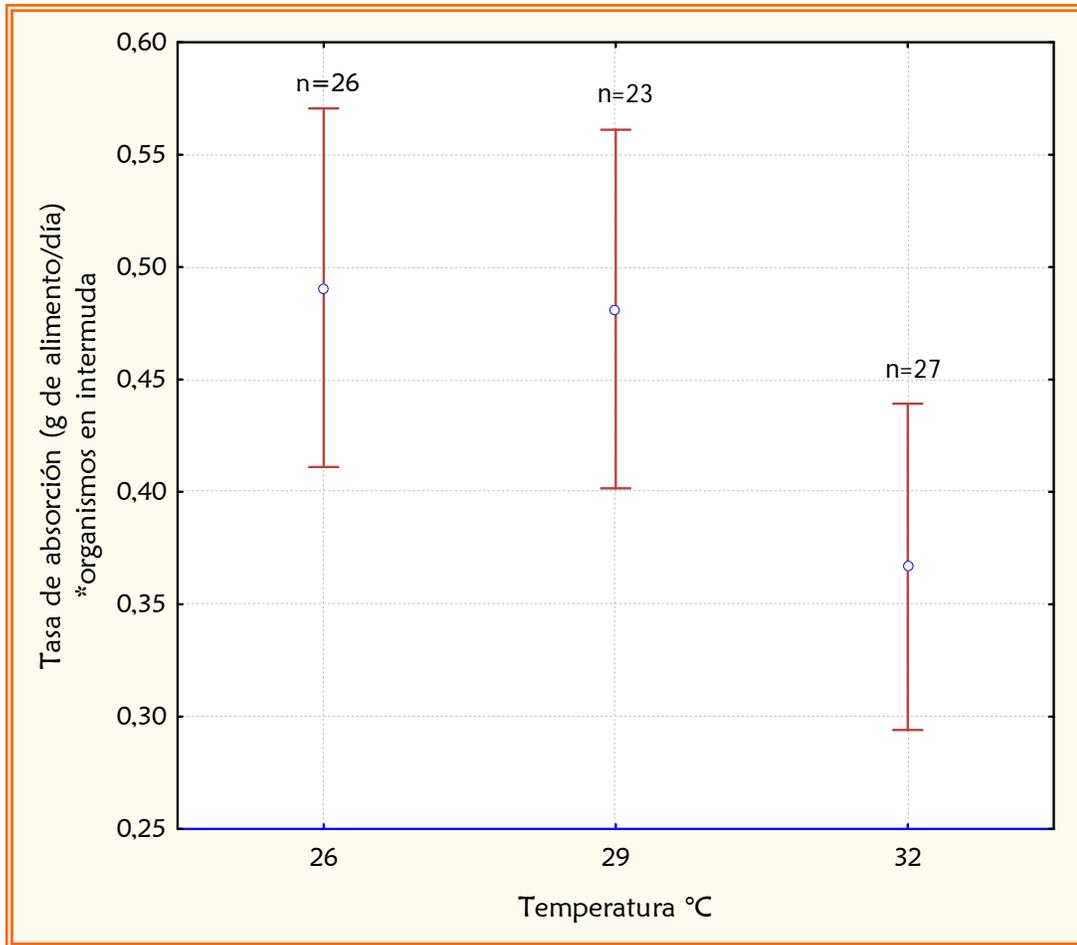


Figura 21. Relación entre la temperatura y las tasas de absorción de alimento en organismos *L. vannamei* en período de intermuda. El cuadro representa la media y las barras denotan el intervalo de confianza al 95%.

7.1.3.3 Resultados para los organismos al final del experimento

Los resultados para las tasas de ingestión calculadas para todos los organismos al final del experimento indican que la temperatura influye significativamente sobre este proceso (ANOVA $p < 0.05$), en este sentido, los organismos que se mantuvieron en la temperatura de 26°C redujeron la cantidad de alimento ingerido con respecto a los organismos que se mantuvieron en la temperatura óptima. Este mismo comportamiento se observó en las tasas de absorción (Figuras 22 y 23).

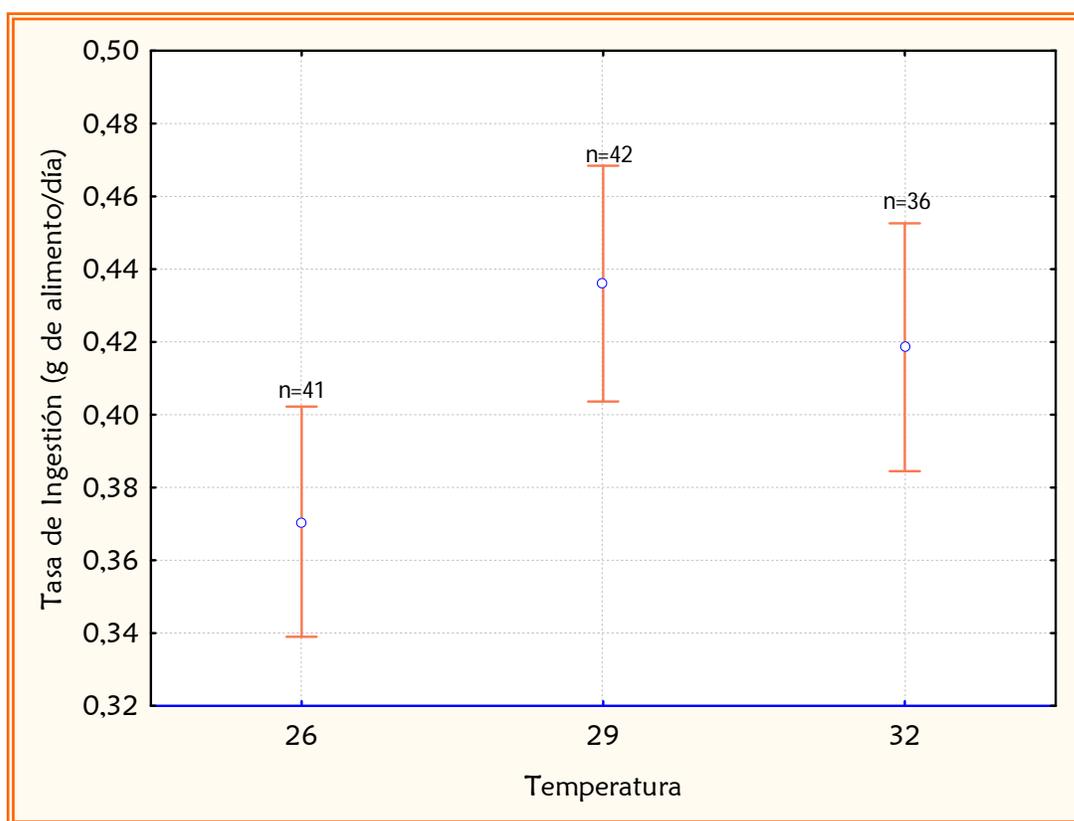


Figura 22. Relación entre la temperatura y las tasas de ingestión de alimento en organismos *L. vannamei*. Las barras denotan el intervalo de confianza al 95%.

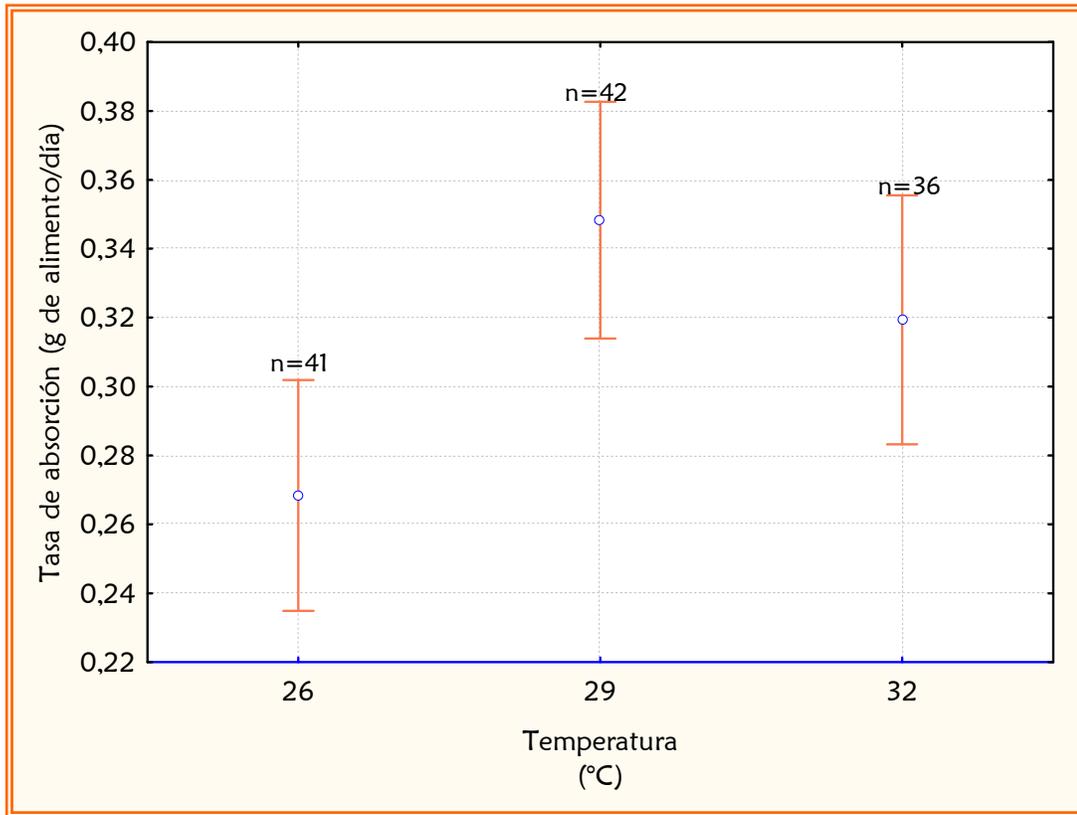


Figura 23. Relación entre la temperatura y las tasas de absorción de alimento en organismos *L. vannamei*. Las barras denotan el intervalo de confianza al 95 %.

7.1.4 CRECIMIENTO

Con relación al análisis aplicado a los datos de crecimiento, éste evidencia la influencia de la temperatura en este proceso ($p < 0.05$) obteniendo un crecimiento menor en los organismos que se encontraban en la temperatura de 26°C, mientras que el crecimiento obtenido en los organismo en las otras dos temperaturas fue similar (Figura 24).

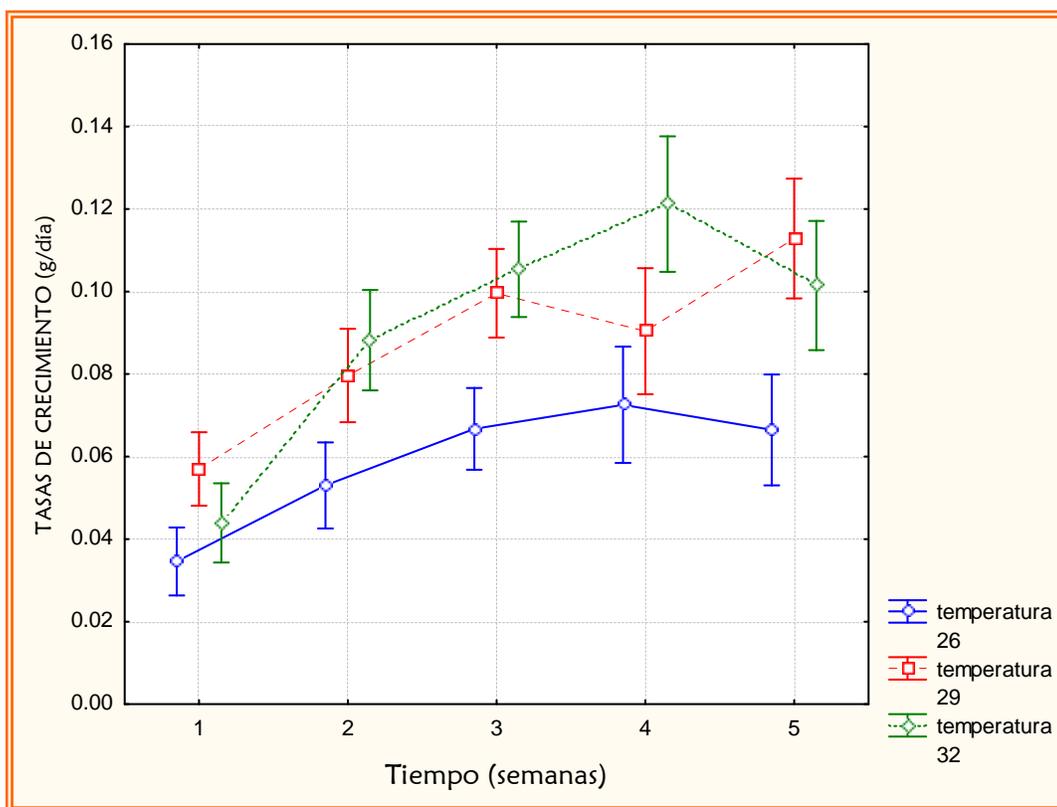


Figura 24. Relación entre la temperatura y las tasas de crecimiento de *L. vannamei*.

7.1.5 APLICACIONES AL MODELO.

Con los resultados de las tasas de ingestión para los juveniles de *L. vannamei* generados en este trabajo y los resultados generados por Galindo (2007) para las tasas de ingestión en adultos, se ajustó la ecuación que define las tasas de ingestión en función al tamaño corporal, para incorporarla al modelo.

$$y=0.4895x-0.8753$$

Donde y es la tasa de ingestión (g/día) y x es el peso seco del organismo (g).

Así mismo, se utilizó el factor de 0.89 para expresar el porcentaje correspondiente al alimento absorbido con base al alimento ingerido, esto es, del 100 por ciento del alimento ingerido, los organismos absorben el 89 por ciento. Estos coeficientes, se utilizaron sólo como una primera aproximación ya que es necesario contar con la información que describa el comportamiento de los organismos durante todo el ciclo de vida.

La base fundamental del presente modelo para *L. vannamei* sobre la cual se centran todos los procesos incluyendo la ingestión y la absorción, es la muda. Los parámetros de bombeo de agua y sobre ciclo de muda fueron proporcionados por Galindo (2007). Todos los demás parámetros del modelo se obtuvieron de la literatura.

El modelo en Stella[®] predice el crecimiento mostrado en la Figura 25. Al final de 9000 horas (375 días) un organismo alcanza 30 g en peso fresco, presentando un total de 63 períodos de muda. Sin embargo, el modelo aún no predice el crecimiento real que un camarón promedio alcanza al final de este tiempo, el cual ha sido estimado en 50 g en peso fresco (Valenzuela, comunicación personal).

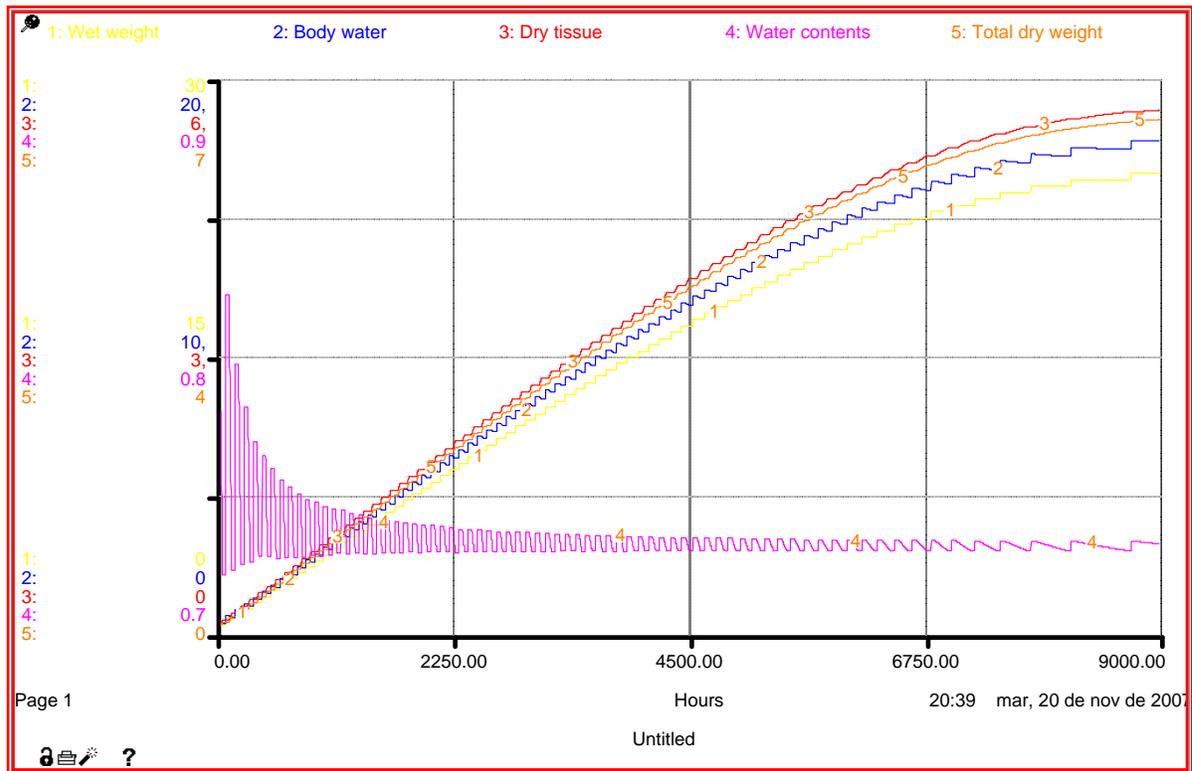


Figura 25. Simulación del crecimiento de *L. vannamei*. El modelo predice el crecimiento de un individuo en relación al ciclo de muda. A partir del agua corporal que pierde momentos antes de la ecdisis, y a la posterior sustitución de esta por biomasa. La curva amarilla indica el crecimiento en peso fresco (g), la curva naranja denota el crecimiento expresado en peso seco, la línea rosa denota el número de mudas que un organismo presenta al final de 9000 horas. Las escalas son diferentes para cada curva.

7.2. VOLUMEN DEL TRACTO DIGESTIVO

La reconstrucción del tracto mediante cortes histológicos para estimar su volumen se realizó para dos organismos juveniles de *L. vannamei* (Figuras 27 y 28).



Figura 26. Fotografía que muestra la morfología macroscópica del tracto digestivo de *L. vannamei*.

Se obtuvieron un total de 3595 cortes histológicos. El volumen calculado se presenta en la tabla 2.

	ORGANISMO		TRACTO DIGESTIVO			
	Longitud total (cm)	Peso (g)	Longitud (cm)	Peso (g)	Volumen total (Por desplazamiento de agua) (mL)	Volumen (aproximaciones geométricas, corresponde al volumen interno) mL
I	6.52	1.89	4.13	0.086	0.1	0.0111
II	6.92	2.32	4.99	0.16	0.2	0.0118

Tabla 2. Medidas morfométricas y ponderales de los organismos y de los tractos digestivos a los cuáles se les evaluó el volumen interno.

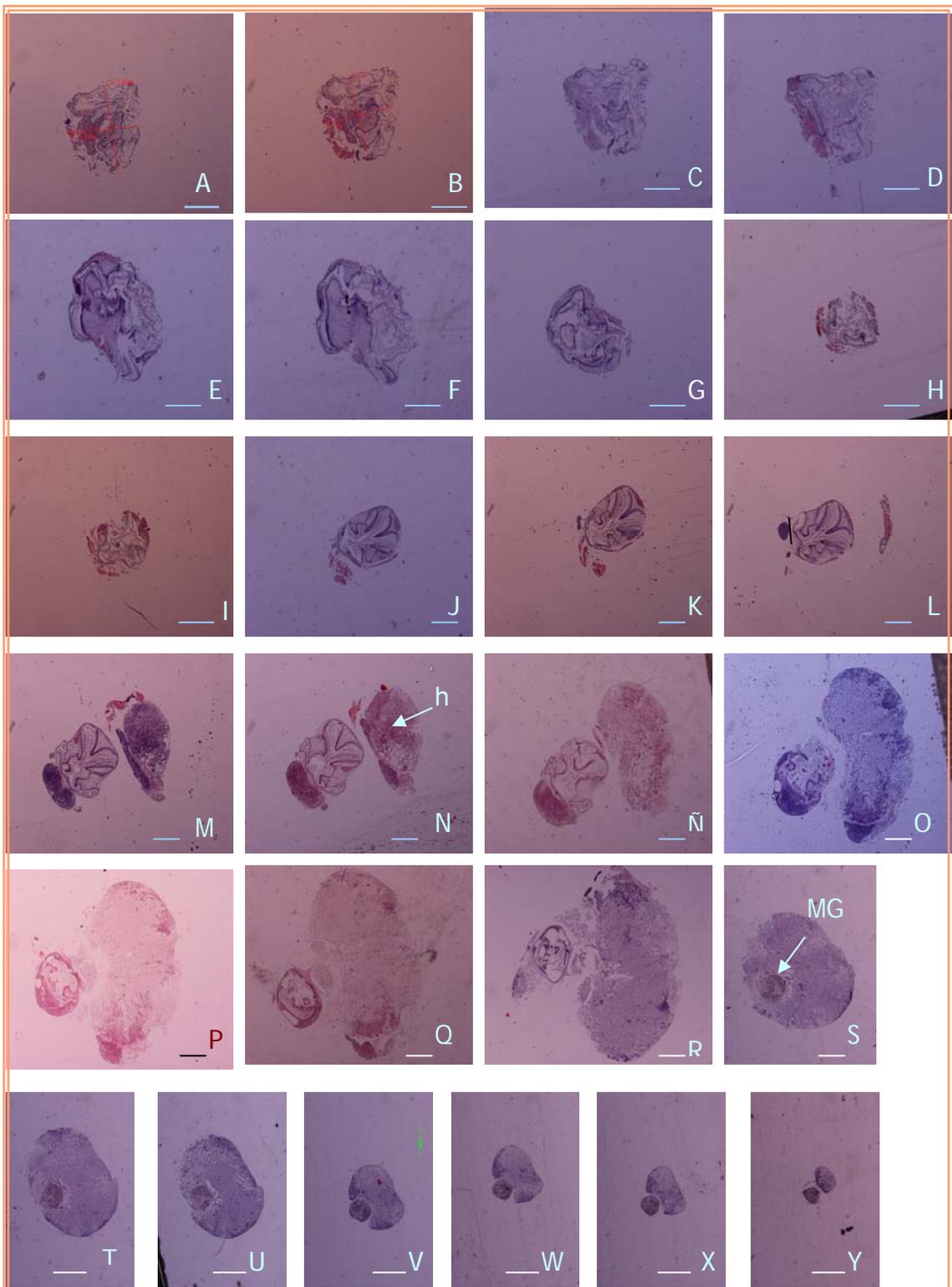


Figura 27. Secuencia de cortes histológicos para la reconstrucción del tracto digestivo de *L. vannamei*. (Organismo I). Las imágenes A-G corresponden al intestino anterior, forman parte del esófago y proventrículo anterior (cámara cardiaca); las imágenes H-R muestran la cámara posterior del proventrículo (cámara pilórica) y la aparición de la glándula digestiva (h), Las imágenes S-Y corresponden al intestino medio (MG) (con base a Dall, 1967). La línea sobre cada fotografía equivale a 1 mm.

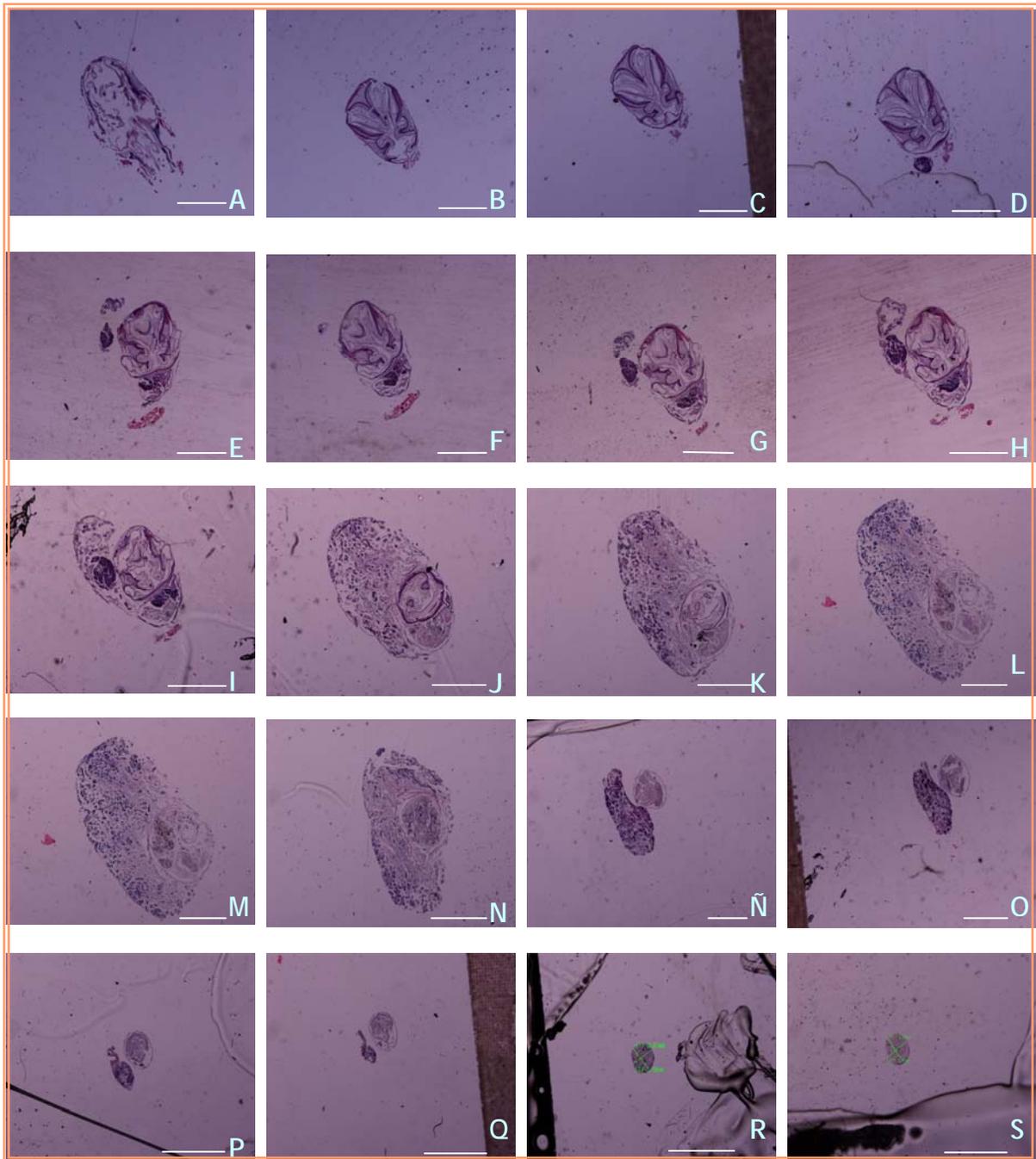


Figura 28. Cortes histológicos para la reconstrucción del tracto digestivo de *L. vannamei*. (Organismo II). Las imágenes A-G corresponden al intestino anterior, forman parte del esófago y proventrículo anterior (cámara cardíaca); las imágenes B-M muestran la cámara posterior del proventrículo (cámara pilórica) y la aparición de la glándula digestiva (h). A partir de la imagen N, se observa el tubo rodeado del hepatopáncreas, las dos estructuras forman parte del intestino medio (MG) (con base a Dall, 1967). La línea equivale a 1 mm.

La relación que existe entre la cantidad de alimento que ingieren los organismos con respecto al volumen del tracto digestivo no se pudo determinar debido al número de organismos a los cuales se les evaluó el volumen interno. Sin embargo, las tasas de ingestión que fueron calculadas para dos grupos de organismos de peso semejante y se presentan en la figura 29. Se puede observar que las tasas de ingestión son similares y de manera preliminar no se observa ninguna tendencia. Sin embargo sí se observó que los organismos de 2.39 g con respecto a los de 1.89 g, empiezan a aumentar la cantidad de alimento que ingieren.

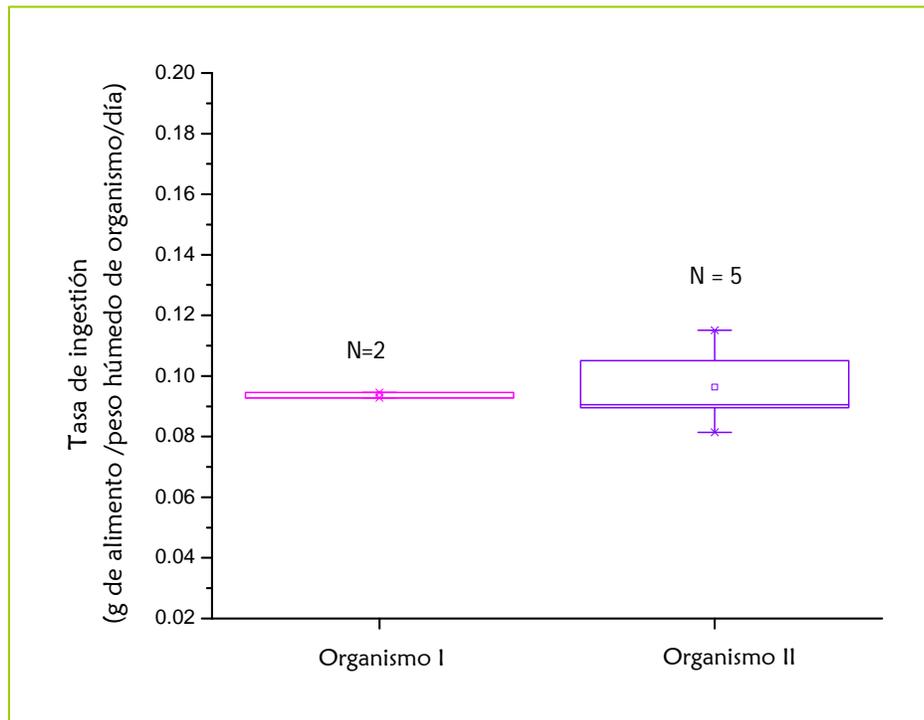


Figura 29. Tasas de ingestión para los organismos de *L. vannamei*. □ Media ± desviación estándar ± intervalo de confianza al 95%

8. DISCUSIÓN

8.1. INGESTIÓN Y ABSORCIÓN

Una de las principales variables y punto de partida del modelo de crecimiento de *L. vannamei* al ser conceptualizado como bioenergético es la ingestión, ya que, ésta es la única forma en la que el organismo obtiene la energía necesaria para repartirla en las diferentes vías metabólicas.

La alimentación en los camarones peneidos está asociada con factores tales como el período y la frecuencia de exposición al alimento (Sedgwick, 1979a; Reymond y Lagardère, 1990), estadio de muda, el tamaño de los organismos, la intensidad de luz (Cuzon *et al.* 1982; Reymond y Lagardère, 1990; Nunes y Parson, 1999), la dispersión del alimento (Nunes y Parson, 1999) ciclos exógenos, tales como las mareas (Marte, 1980), las variaciones en la calidad del agua y en condiciones de cultivo, a las condiciones ya mencionadas se suman la composición de la dieta artificial (Choe, 1971; Sedgwick, 1979b).

El modelo exige conocer cómo afecta cada uno de los factores anteriormente descritos al proceso alimentario, y para propósitos de este trabajo, el control de una gran parte de ellos fue muy importante para que el crecimiento de los organismos estuviera sólo en función de la temperatura, la ingestión y por ende de la absorción de los nutrimentos.

La temperatura actúa como factor controlador determinando los requerimientos metabólicos y gobernando los procesos relacionados con la transformación del alimento. La mayoría de las especies presentan un rápido crecimiento con el aumento de la temperatura hasta un cierto punto (temperatura óptima) pasado el cual, generalmente, el crecimiento desciende (Calderer, 2001). El mismo efecto acontece con la intensidad a la que un organismo se alimenta. El incremento de la temperatura aumenta el apetito hasta un cierto punto a partir del cual lo pierde (Brett *et al.*, 1979; Wyban *et al.* 1995).

El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio muestra que el consumo y absorción de alimento en *L. vannamei* no fueron significativamente

diferentes en el intervalo de las temperaturas evaluadas (26-32°C). Wyban *et al.* (1995), en cambio, encontraron diferencias significativas pero considerando un intervalo más amplio (23, 27 y 30°C), con temperaturas más bajas.

Resultados similares a los de Wyban *et al.* (1995) se han encontrado para otras especies de decápodos. Nunes *et al.* (1996) encontraron que bajo condiciones de cultivo la calidad del agua, incluyendo la temperatura afecta la ingestión de alimento en *Penaeus subtilis*; así mismo, Wasielesky *et al.* (2003) encontraron que el consumo de alimento en *Farfantepenaeus paulensis* depende de la temperatura, pero el intervalo que ellos evaluaron fue más grande, y las diferencias más importantes se presentaron en organismos mantenidos a la temperatura más baja (16°C) con respecto a los que se mantuvieron en temperaturas de 26, 29 y 32°C. Al igual que en este trabajo, en estas tres últimas temperaturas la ingestión de alimento fue similar.

Las diferencias en las respuestas encontradas en este trabajo y los resultados de Wyban *et al.* (1995), sobre la influencia de la temperatura en el consumo de alimento, se pueden deber a que se utilizaron diferentes metodologías, ya que estos autores evaluaron la ingestión en grupos de organismos y en nuestro caso se evaluó individualmente.

A diferencia de los resultados que se obtuvieron realizando las evaluaciones individuales de la tasa de ingestión y absorción para los organismos durante todo el periodo experimental, cuando se realizó el análisis de datos para un solo día con todos los organismos, se encontró que sí había una respuesta, ya que la cantidad de alimento consumido y absorbido fue mayor en las temperaturas de 29 y 32°C con respecto a la de 26°C. Este comportamiento contradice los resultados encontrados para los organismos individualizados durante el periodo que duró el experimento. Esta discrepancia en los resultados se puede deber a que el número de muestras a lo largo del experimento no fue suficiente para evidenciar la respuesta.

Bajo condiciones de cultivo y condiciones naturales, el consumo de alimento en los camarones peneidos está caracterizado por algunos patrones. Los ritmos de alimentación dependen de varios factores incluyendo los factores fisiológicos tales como el estado de muda (Cadena, 2000). Para eliminar este factor, el análisis de datos se hizo

agrupando a los organismos de acuerdo a su estado fisiológico: intermuda y postmuda (Galindo, 2007). El considerar sólo dos grupos de acuerdo al estadio de muda, también pudo ser un factor responsable de no haber observado diferencias significativas en las tasas de ingestión-absorción durante todo el experimento, ya que como lo refiere Cadena (2000) la cantidad de alimento que ingiere *L. vannamei* es diferente en cada estadio de muda y Galindo (2007) evidenció que en adultos existe un periodo de ~100 h en el cual la tasa de ingestión disminuye, 64 horas antes de la muda y 44 h después de que la ecdisis se ha presentado.

Si bien hay un gran número de trabajos que muestran el efecto de los factores que definen la cantidad de alimento que un organismo ingiere, la metodología empleada en ellos sólo permite el análisis de estas respuestas desde un punto de vista poblacional. La importancia del presente trabajo radica en el planteamiento analítico, pues ha sido posible estudiar cómo los organismos responden individualmente.

8.2. CRECIMIENTO

La temperatura es uno de los factores más importantes que controla el crecimiento de los camarones marinos.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el crecimiento en juveniles de *L. vannamei* estuvo afectado por la temperatura. Se obtuvo un mayor crecimiento en los organismos que se mantuvieron a una temperatura de 32 °C en comparación a aquéllos que se encontraban a 26°C.

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Menz y Blake (1980), quienes en un esfuerzo por analizar el crecimiento de *L. vannamei* encontraron que la temperatura influye notablemente en el crecimiento de los organismos. En los experimentos que llevaron a cabo durante los años de 1977 y 1978 a diferentes temperaturas, el incremento en peso en una semana para organismos mantenidos en condiciones de 23-25°C fue del 17%, para organismos mantenidos en condiciones de 28-30 °C fue del 23% y para aquéllos mantenidos en 32-36°C el crecimiento fue del 55% ampliando inclusive el intervalo de temperatura óptima.

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento estimado para *L. vannamei* fue consistente con datos experimentales para otras especies de peneidos. Zein-eldin y Griffith (1966) encontraron que las postlarvas *Penaeus aztecus* tienen una clara respuesta a la temperatura, la cual se traduce en una ganancia mayor de biomasa, cuando los organismos se mantienen a temperaturas consideradas altas para esta especie (25-32°C) con respecto a temperaturas bajas (15-22°C). Así mismo, observaron que cuando se mantienen a temperaturas de 35°C los organismos no crecen y por el contrario el índice de sobrevivencia empieza a decaer.

Para el caso de *L. setiferus* y *P. aztecus* la temperatura es tan importante que se ha observado que a temperaturas bajas (12 y 17°C) cesa por completo su actividad y permanecen enterrados en el sustrato (Aldrich *et al.*, 1968). Rubino *et al.* (1983) encontraron diferencias en el crecimiento debidas a la temperatura y observaron un mejor crecimiento en los camarones *P. aztecus* y *P. stylirostris* en temperaturas de 25-30°C.

Trabajos más recientes han establecido que el camarón café (*Farfantepenaeus californiensis*) responde con un mayor crecimiento a temperaturas altas (López-Martínez *et al.*, 2003). Así mismo se ha encontrado que en condiciones de laboratorio la duración de los estadios larvales en el camarón café está inversamente relacionada a la temperatura (Villareal y Hernández-Llamas, 2005).

El crecimiento de *L. vannamei* fue diferente en los tratamientos, a pesar de que el inicio del experimento estuvo desfasado para cada temperatura (la evaluación del crecimiento de los organismos en la temperatura de 26°C comenzó el 24 de octubre, la de 29 °C el 31 de octubre y la de 32°C el 8 de noviembre) La relación de cómo la temperatura define el crecimiento de manera diferencial en la especie siempre estuvo presente, sin embargo para eliminar esta fuente de error, el análisis estadístico se realizó para el grupo de datos generados a partir de la tercera semana de haber iniciado el experimento.

Otra posible fuente de error que se controló fue la variabilidad genética, ya que todos los organismos procedieron de un solo desove, es decir tenían la misma

información genética y las variaciones en el crecimiento debidas a este factor se *minimizaron*.

Entre todos los factores externos que influyen en la ingestión, absorción y por lo tanto en el crecimiento de los organismos, la temperatura es el más importante. Sin embargo, en los experimentos realizados en este trabajo la influencia sólo se observó para el crecimiento, lo que permite suponer que algunos procesos internos pueden compensar el efecto del ambiente externo, además que el intervalo de temperaturas en el que se evaluó la respuesta delimita los límites del intervalo óptimo. Los organismos tienen la capacidad para aclimatarse a estas variaciones por lo que es posible que este intervalo sea lo suficientemente estrecho para que no se detecten diferencias.

8.3. APLICACIONES AL MODELO

Para construir un modelo de crecimiento es necesario tener la información cuantitativa en todo el proceso fisiológico que describe el presupuesto de la energía de cualquier organismo: alimentación, ingestión, absorción, respiración, excreción y para el caso particular de los crustáceos la muda. Todos estos procesos dependen de factores externos (ambientales) e internos (fisiológicos y bioquímicos).

Los parámetros generados en el presente estudio para integrarlos al modelo general de crecimiento de *L.vannamei* aportan información sobre la cantidad de alimento que ingieren los organismos y la tasa de absorción.

La respuesta en el crecimiento utilizando a la temperatura como la variable en estudio muestra una gran variabilidad, por lo que resulta complejo el proceso de integración al modelo debido a que para que el modelo funcione para las diferentes temperaturas es necesario conocer como funciona cada uno de los factores que describen el crecimiento de los organismos a las temperaturas en cuestión y aún falta completar la información para la temperatura óptima.

Precisamente por la falta de información, los primeros intentos por poner a funcionar el modelo con los datos experimentales, sólo se realizaron con la ingestión y

absorción calculada para los organismos mantenidos a 29°C, es importante mencionar que en este trabajo se obtuvieron sólo las tasas de ingestión y absorción para los juveniles de *L. vannamei* y el modelo exige contar con una ecuación que describa el comportamiento de los organismos en todo el ciclo de vida, debido a que cuando los organismos aumentan en tamaño las tasas de ingestión se reducen.

Como se mencionó anteriormente para ajustar la ecuación que describe la ingestión de *L. vannamei* se utilizaron datos experimentales provenientes de otros experimentos, llevados a cabo en el mismo laboratorio en el mismo periodo de tiempo y bajo las mismas condiciones experimentales como son los obtenidos por Galindo (2007).

La gráfica que se presenta en los resultados (Figura 25) y que describe el crecimiento de los organismos está basada en el evento más importante asociado al crecimiento en los camarones: la muda (Hartnoll, 1985).

Si bien los resultados obtenidos pueden parecer aislados y complicados de introducir en el modelo general de crecimiento individual de *L. vannamei* es necesario destacar la importancia de ello, ya que estos datos servirán a mediano plazo para completar y describir todo el proceso de crecimiento para una sola especie.

Como se ha mostrado en el desarrollo de este trabajo, los organismos se comportan de una manera similar ante variaciones en la calidad del agua específicamente a diferentes temperaturas. Sin embargo, cada especie se desarrolla dentro de límites que son únicos para ella y la comparación con otras no es sencilla. Cabe mencionar que, si bien en estos primeros intentos por completar la serie de parámetros se utilizaron algunos datos de otras especies tal como lo hacen Mishra (2002) y Franco *et al.* (2006), trabajos como el que aquí se presenta aportan al conocimiento de la biología de una especie y permiten reducir los supuestos que implica utilizar valores estimados en otras condiciones o en otras especies.

Mientras que Franco *et al.* (2006) obtienen un crecimiento expresado en ganancia en biomasa (g) de 45 g al término de un año (en hembras), el modelo base de este trabajo obtiene un camarón de 30 g en el mismo periodo. Los datos experimentales muestran que *L. vannamei* en este periodo llega a alcanzar 50 g así que es necesario

aumentar los esfuerzos para que obtengan la totalidad de los parámetros del modelo de crecimiento.

8.4. VOLUMEN DEL TRACTO DIGESTIVO

La sobrealimentación ha sido referida como una de las principales causas del deterioro de la calidad de agua en los sistemas de cultivo y en las áreas costeras adyacentes a estos (Nunes y Parson, 1996).

En el proceso de la generación de un modelo matemático para predecir el crecimiento de un camarón, se busca encontrar una estructura que sea un indicador de saciedad y que permita incorporar al modelo el momento justo en el cual un organismo deja de consumir alimento.

En este sentido se ha estudiado el mecanismo por el cual un organismo deja de ingerir alimento. Al-Mohanna y Nott (1987), desde el punto de vista fisiológico, sugieren que cuando un organismo ha tenido una alimentación completa, el ciclo digestivo completo se lleva a cabo en menos de 24 horas. Por lo tanto, cuando un organismo se alimenta exitosamente, la glándula digestiva se "llena" en toda su capacidad con el quimo y las partículas finas producidas por la masticación y por la digestión primera en el estómago. Fisiológicamente, no se requiere alimento adicional hasta que la digestión y la asimilación se han completado, los residuos han sido eliminados de la glándula y el epitelio mermado se ha reorganizado con células nuevamente diferenciadas. Sin embargo esto no nos da información de qué cantidad de alimento se debe ofrecer.

Reymond y Lagardère (1990) y Nunes *et al.* (1997) utilizaron el índice de repleción gástrica para describir el porcentaje de organismos con alimento en su tracto digestivo y describir las proporciones del alimento artificial y alimento vivo con respecto al total del contenido gástrico. Esta información ha sido utilizada también para describir las posibles diferencias entre la hora en la cual son alimentados los organismos. En base a esto se ha evidenciado que en *Penaeus japonicus* no hay relación entre la hora (conceptualizada desde una relación hora-cantidad de luz) y la cantidad de alimento ingerido.

Como complemento al índice de repleción gástrica, en los sistemas de cultivo, se han estudiado las preferencias de varios peneidos al seleccionar sus presas utilizando la relación volumétrica que hay entre los diferentes taxa, con respecto al porcentaje total de llenado de tracto digestivo, para *Penaeus subtilis* los organismos más atractivos son los poliquetos ya que representan el 83.83% de todas las presas ingeridas, y a su vez esto equivale al 32.55% del alimento total consumido.

Hasta este momento uno de los indicadores más poderosos de la cantidad máxima que un organismo puede ingerir, es el peso corporal, ya que está demostrado que hay una relación entre estas dos variables que, para *P. subtilis* está dada por: $MM = 0.093BW^{0.6200}$, donde MM es la cantidad máxima que consume el organismo y BW es el peso corporal (Nunes y Parson, 2000). En base a esto la cantidad máxima de alimento que puede consumir un camarón de 1.86 ± 0.03 g en una hora, es de 0.296 g (alimento seco ingerido/camarón) y la tasa de ingestión promedio es de 0.166 g de alimento seco/camarón.

Se ha evaluado en diferentes especies de peneidos el tiempo en el cual los organismos cesan su actividad alimenticia considerando que el organismo está saciado y se han encontrado variaciones dependiendo de la especie. *P. setiferus* se pueden alimentar hasta por un período de 2 a 3 horas ingiriendo la mayor cantidad de alimento en los primeros minutos (Hentschel y Feller, 1990), mientras que *P. subtilis* se alimenta durante los primeros 10 minutos después de haberles ofrecido el alimento, después de ese tiempo la actividad alimenticia decrece sustancialmente. Así mismo, Nunes *et al.*, (1996) reportaron que bajo condiciones semi-intensivas de cultivo *Penaeus subtilis* consume la mayoría de pellets en la media hora posterior a la distribución del alimento, lo cual está relacionado probablemente a la reducción de la quimioatractividad y propiedades gustativas del alimento después de su inmersión en el agua.

Nunes y Parson (1999) estimaron que el contenido estomacal promedio media hora después de haberles proporcionado el alimento a organismos juveniles de *Penaeus subtilis* (87 días de edad) es de 0.010 g/peso seco, si tomamos en cuenta las tres raciones de alimento que se administraron a los organismos de *P. subtilis* el promedio del contenido estomacal por día sería de 0.017 g (alimento/peso seco), si comparamos estos datos con resultados obtenidos en la evaluación de las tasas de ingestión en este

trabajo para un organismo de *L. vannamei* con aproximadamente los mismos días de edad el organismo ingiere 0.44 g de alimento (peso seco) por día, lo que no evidencia al menos una correspondencia de la cantidad de alimento ingerido. Sin embargo con estos datos no se puede proponer alguna conclusión debido a que las metodologías para calcular las tasas de ingestión fueron diferentes.

Los resultados que se presentan en este estudio son insuficientes para poder confirmar que el volumen del tracto digestivo pueda ser considerado como un indicador de saciedad, sin embargo sí aportan información sobre la metodología a seguir para completar la información necesaria y poder establecer o descartar al volumen del tracto digestivo como un indicador de saciedad.

CAPÍTULO II

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *L. vannamei* A LA TEMPERATURA Y AL CICLO DE MUDA.

9. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las características estructurales y funcionales de un organismo están especialmente diseñadas para su desempeño en un hábitat en particular. Las condiciones ambientales en las que se encuentra se reflejan en el estado fisiológico individual.

Desde los años sesenta los investigadores interesados en estudios ambientales han usado una gran variedad de respuestas fisiológicas para evaluar el efecto de contaminantes en organismos y se ha hecho un gran esfuerzo para evaluar índices de estrés con valores predictivos (Alcaraz, 2000).

De hecho, se han desarrollado algunas líneas de investigación, tales como la ecotoxicología que se basan en la premisa de que la perturbación ambiental puede ser identificada a través de la condición biológica de los individuos, debido a que los organismos individuales son las unidades básicas del ecosistema, la fuente del deterioro de la población y de la comunidad se encuentra en este nivel (Alcaraz, 2000).

Contar con métodos rápidos de evaluación e interpretación de los *factores que producen estrés* (contaminantes, alteraciones ambientales, agentes patológicos) en organismos marinos es cada vez más necesario, para que la toma de decisiones pueda hacerse y la degradación del medio ambiente pueda evaluarse (Malins y Ostrander, 1991). Ante esta necesidad, se han realizado varias investigaciones para buscar y estandarizar métodos que permitan diagnosticar el estado fisiológico de los organismos.

Particularmente en los crustáceos, uno de los primeros biomarcadores propuestos para supervisar la condición fisiológica de estos organismos, ha sido la capacidad osmótica. Lignot *et al.* (2000) hicieron una revisión exhaustiva de los trabajos que han examinado a la capacidad osmótica en crustáceos como respuesta a varios factores causantes de estrés. Los autores encontraron que en organismos cultivados la

osmorregulación ha sido alterada en el 97% de camarones peneidos y en el 100% en cangrejos expuestos a varios tipos de estrés.

Actualmente, el desarrollo de las herramientas de evaluación bioquímica ha permitido diseñar métodos de diagnóstico del estado nutricional de los organismos, los cuales pueden considerarse como indicadores del estado de salud general de los organismos cultivados (Pascual, *et al.*, 2003).

Entre las herramientas de diagnóstico que se han considerado se encuentran algunos metabolitos sanguíneos: glucosa, colesterol, acilglicéridos, proteínas y lactato; el glucógeno en la glándula digestiva, los niveles de oxi-hemocianina (OxyHc), la presión osmótica y la respuesta inmune (Rosas *et al.*, 2002b; Pascual, *et al.*, 2003; Pascual, *et al.*, 2004).

Las proteínas ocupan una posición central debido a que son la base para formar enzimas, hormonas, hemocianina, son componentes de la respuesta inmunitaria y además intervienen directamente en la construcción de tejidos, en la reparación y mantenimiento de estos. Así mismo son fuente de energía en los procesos catabólicos y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Pascual, 2003).

La hemocianina es un polipéptido que tiene incorporado el cobre, el cual funciona como transportador de oxígeno. Representa el 60-95% del total de proteínas en la hemolinfa en crustáceos (Djangmah, 1970). Las concentraciones de hemocianina son sensibles a las altas concentraciones de amonio (Chen *et al.*, 1994; Chen y cheng, 1995), nitrito y salinidad.

Los triacilglicéridos se encuentran entre los lípidos más importantes ya que representan la mayor fuente de energía y la forma predominante de almacenamiento. Así mismo el colesterol que no puede ser sintetizado por los camarones y lo obtienen de la dieta, es precursor de la vitamina D, (la cual controla la digestión y almacenamiento del calcio) y de hormonas esteroides (hormona involucrada en la reproducción y en el ciclo de muda).

La glucosa es uno de los carbohidratos más importantes, ya que es fuente de energía y es necesaria para la formación de la quitina, glucoproteína que forma el exoesqueleto. Una vez que el almidón es ingerido, es hidrolizado para producir glucosa, la cual es a su vez liberada lentamente en sangre, la α -amilasa es la responsable de este proceso (Rosas y Carrillo, 2006). Otro carbohidrato importante es el lactato, producto del metabolismo de carbohidratos asociado a condiciones de estrés, por activación del metabolismo anaerobio. Se ha observado que las concentraciones de glucosa varían cuando los camarones se alimentan con diferentes tipos de dieta y son expuestos a diferentes salinidades (Rosas *et al.*, 2001).

El glucógeno es una sustancia de reserva que se deposita en las células de la glándula digestiva (Al-Mohanna y Nott, 1987). Es importante para los camarones pues es una fuente para la síntesis de N-acetil glucosamina, sillar principal para la síntesis de quitina, la cual a su vez es la molécula de la cual está formado el exoesqueleto (Gwinn and Stevenson, 1973). En un estudio realizado con *L. stylirostris* (Cuzon *et al.*, 2003) demostraron que los niveles de glucógeno de la glándula digestiva aumentan junto con el peso de los camarones en premuda, indicando la participación de éste en la formación de la nueva cutícula.

La mayoría de los indicadores hasta ahora propuestos han sido resultado de la investigación sobre la nutrición, ya que el alimento aporta a los camarones, a través de las proteínas, lípidos y carbohidratos, las moléculas base que son utilizadas como fuente de energía y de moléculas estructurales, las vitaminas y los minerales, actúan como factores esenciales para el buen funcionamiento de la maquinaria enzimática permitiendo la asimilación adecuada de los nutrientes ingeridos (Pascual *et al.*, 2003).

El conocimiento de la nutrición de los decápodos también ha propiciado que la enzimología como parte de esta área se desarrolle ampliamente, como respuesta a la necesidad de generar el conocimiento para comprender todos los procesos que están relacionados (García-Carreño, 1996).

La enzimología ha avanzado a niveles de conocimiento como: estructura estereoquímica de sitios catalíticos y accesorios en la molécula de la enzima, mecanismos de estabilización de la cadena polipeptídica (ingeniería de proteínas),

afinidad y especificidad por el sustrato, mecanismos de inhibición, eficiencia catalítica, actividad molecular, mecanismos de catálisis, etc. La aplicación del conocimiento sobre enzimología para resolver problemas prácticos se conoce como tecnología enzimática. La única forma de controlar los fenómenos que rigen una actividad productiva: pasar de la artesanía a la tecnología es conociendo estos fenómenos a mayor detalle posible (García-Carreño, 1996).

En la nutrición de los crustáceos la utilidad de las enzimas ha sido su empleo en técnicas para determinar *in vitro* la digestibilidad de dietas, como aditivos alimentarios y para estudiar el efecto de inhibidores de proteasas presentes en el alimento. El conocimiento de las reacciones involucradas en el sistema digestivo es necesario para realizar mejores formulaciones, presentaciones de dietas, y gran parte del esfuerzo se ha encaminado a contestar estas interrogantes y han dejado a un lado la información básica que puede aportar información valiosa que puede ser empleada en conjunto para obtener un mejor conocimiento sobre las especies.

Las tripsinas, entre las proteasas, y las amilasas, entre las carbohidrasas, son las enzimas más activas en *Penaeus vannamei* (Van Wormhoudt *et al.* 1996). La α -amilasa cataliza la hidrólisis del enlace α -1-4 de los azúcares. La tripsina, endoproteasa de la familia de las serin-proteasas, se caracteriza por un mecanismo catalítico común, implicando tres residuos aminoacídicos (histidina, ácido aspártico y serina) hidrolizando el enlace peptídico del lado carboxílico de la arginina o de la lisina. En los vertebrados esta enzima es sintetizada bajo la forma de un zimógeno inactivo. En camarones (*L. vannamei*) se han descrito zimógenos para la tripsina y quimiotripsina (Sellos y Van Wormhoudt, 1992; Le Boulay, *et al.*, 1996).

La mayoría de los catalizadores químicos muestran un incremento en la actividad con el incremento de la temperatura y las enzimas no son la excepción. Las enzimas también son proteínas y como todas las proteínas se desnaturalizan a temperaturas elevadas (Figura, 30). Por lo tanto el aumento de la eficiencia catalítica con el incremento de la temperatura está comprometido por los efectos de una desnaturalización a temperaturas elevadas. Por esta razón la actividad de una enzima típica se incrementará con la temperatura sobre un intervalo finito para luego disminuir

significativamente por encima de la temperatura crítica característica de la desnaturalización de la proteína (Copeland, 1996).

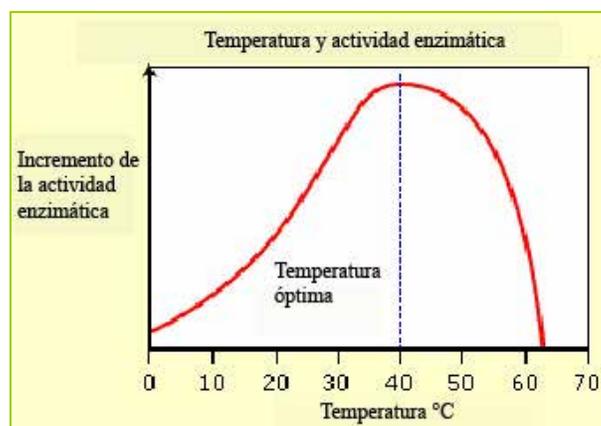


Figura 30. Esquema del comportamiento de la actividad enzimática con respecto a la temperatura (Holum, 1968).

La actividad enzimática es determinada ampliamente por la disponibilidad de sustrato y cofactores, la influencia de parámetros físicos ambientales tales como la temperatura y la presión, salinidad, la interacción con una clase de metabolitos llamados moduladores enzimáticos (Molina-Poveda *et al.*, 2002).

Particularmente la actividad de las enzimas digestivas en camarones además de los factores señalados, también está determinada por la edad, tamaño del organismo, los cambios ontogénicos, el ayuno, los ingredientes en la dieta, nivel y fuente proteica, cantidad y frecuencia de alimentación, ritmos circadianos y el ciclo de muda (Molina-Poveda *et al.*, 2002; Gamboa, 2001).

Todos los procesos fisiológicos en los crustáceos, están asociados con los eventos que se presentan en los diferentes estadios de muda, proceso por el cual los organismos crecen. El ciclo de muda influye en muchos aspectos de la biología de los crustáceos, incluyendo la morfología, fisiología y conducta (Skinner, 1985a,b; Dall, 1990). Está controlado por hormonas neurosecretoras de los órganos-X y -Y localizados en los tallos oculares y cerca de la región bucal, respectivamente (Skinner, 1985a,b).

El principal evento que toma lugar cuando un crustáceo entra en un periodo de crecimiento es la síntesis de la epi y exo cutícula de un nuevo exoesqueleto debajo del viejo exoesqueleto (Skinner, *et al.*, 1985a,b).

Cuando los organismos liberan la cutícula absorben agua para aumentar su volumen antes de comenzar el proceso de mineralización del nuevo esqueleto, para el cual utilizarán las reservas orgánicas (Stevenson, 1985).

El ciclo de muda se divide en cinco estadios (Figura, 31), los cuales se pueden distinguir por el grado de dureza del exoesqueleto: postmuda temprana (A), postmuda tardía (B), intermuda (estadio C), premuda temprana (D₀ - D₁), premuda tardía (D₂). La ecdisis, denominado estadio E, ocurre en menos de un minuto (Drach y Tchernigovtzeff, 1967; Aquacop *et al.*, 1975; Robertson *et al.*, 1987; Skinner, 1985a,b; Chan *et al.*, 1988).

El estadio A, ocurre inmediatamente después de la ecdisis (Robertson *et al.*, 1987). El exoesqueleto está blando y descalcificado, la epidermis está transparente con una pequeña pigmentación.

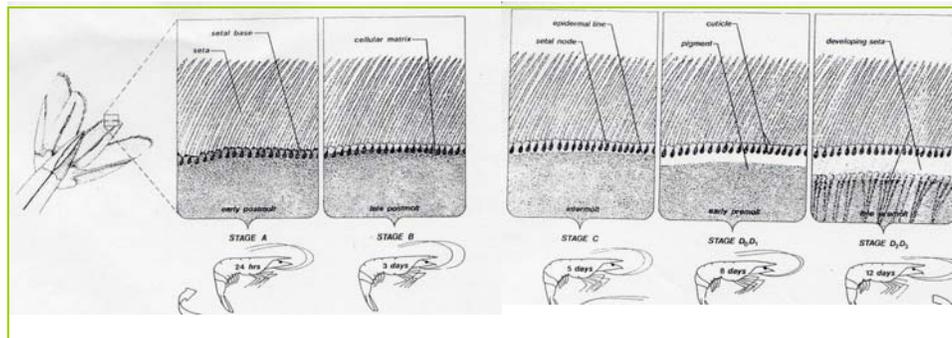


Figura 31. Estadios del ciclo de muda en base a los cambios setales de los urópodos. Reproducido de Robertson, 1987.

Durante el estadio B, el exoesqueleto se endurece debido al depósito de calcio, y la pigmentación epidermal se incrementa. En este periodo la matriz setal aparece granular y comienza a retraerse del lumen setal hacia la base de las setas. Un cono interno comienza a formarse en cada seta hacia el final de este estadio.

En el estadio C, la calcificación del exoesqueleto se completa, se forma una línea conocida como línea epidermal en la base del nodo setal.

El estadio D, comienza con la apolisis, que es la separación de la endocutícula de la epidermis. El proceso para *L. vannamei* comienza primero en la región posterior de los endopoditos y está acompañada por la reabsorción y de la descalcificación del exoesqueleto.

El proceso de la muda asociado con el de la reproducción son los dos eventos fundamentales en la vida de los crustáceos (Casillas-Hernández *et al.*, 2002). Los cambios estructurales y morfológicos que operan durante el ciclo de muda se reflejan en variaciones físicas y fisiológicas en diferentes tejidos, especialmente en la hemolinfa y hepatopáncreas (Passano, 1960).

Ante este panorama, el avance de los conocimientos sobre los procesos que regulan la digestión de alimento en el camarón en los últimos años es indudable sin embargo hay aún preguntas que responder; a pesar de que la temperatura rige todos los procesos metabólicos aún no se puede encontrar información de que tanto este factor influye en la actividad de las enzimas digestivas y como responde el medio interno de los organismos expuestos a diferentes temperaturas, y qué tanto este factor se puede asociar con el ciclo de muda para provocar una respuesta sinérgica por lo tanto con este trabajo se pretende contestar estas interrogantes.

10. HIPÓTESIS

La temperatura es un factor controlador del metabolismo. Dentro del preferendum térmico, un aumento de temperatura provocará un aumento en las tasas de ingestión de alimento, lo cual estimulará la actividad de las enzimas digestivas y provocará una mayor concentración de los metabolitos de reserva y los circulantes en sangre. El ciclo de muda actúa directamente sobre el mecanismo de control fisiológico, durante la muda hay un aumento significativo de los metabolitos circulantes en sangre y en las reservas de glucógeno derivadas del control hormonal que se ejerce sobre el hepatopáncreas. Los efectos de la temperatura y el ciclo de muda que provocan se presentarán de forma sinérgica.

11. OBJETIVOS

11.1 OBJETIVO GENERAL

- ☞ Evaluar la actividad de las enzimas digestivas y metabolitos sanguíneos como respuesta a la variabilidad en la temperatura y al ciclo de muda.

11.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ☞ Evaluar el comportamiento de la capacidad osmótica, glucosa, glucógeno y hemocianina ante variaciones en la temperatura y el ciclo de muda.
- ☞ Evaluar la actividad de las enzimas α -amilasa y la tripsina como respuesta a la temperatura y a los estadios del ciclo de muda.

12. MATERIAL Y MÉTODOS

12.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.

La evaluación de la actividad enzimática y metabolitos sanguíneos en función de las variaciones en la temperatura y el ciclo de muda se realizó utilizando un sistema de recirculación, formado por tres tinas experimentales de una capacidad de 400 L conectados a un sistema hidráulico compuesto por dos tanques habilitados uno con un calentador y el otro con un enfriador, para obtener las temperaturas a evaluar. Las temperaturas de los extremos se obtuvieron directamente de los tanques y la temperatura intermedia se obtuvo regulando la proporción de agua de las diferentes temperaturas que entraba de cada tanque.

Al inicio del experimento se colocaron aleatoriamente 20 camarones en cada una de las condiciones de temperatura a evaluar y se registraron las medidas morfométricas y ponderales.

Los organismos se alimentaron 2 veces al día con alimento pelletizado preparado con la formulación de mayor crecimiento, en base a la formulación de Gaxiola (ANEXO I). La cantidad de alimento proporcionado se calculó de acuerdo al 20% del peso de la biomasa total en cada uno de las tinas experimentales. Los organismos se alimentaron por un período de dos horas al final del cual se les retiró el alimento remanente y heces producidas.

La temperatura del agua se monitoreó constantemente, para realizar los ajustes necesarios en caso de que hubiera cambios.

Los organismos se mantuvieron en las condiciones experimentales antes descritas durante un periodo de 30 días, una vez transcurrido este tiempo los organismos se sacrificaron para evaluar la actividad enzimática (tripsina y α -amilasa), el comportamiento de los metabolitos sanguíneos (glucosa y hemocianina), así como la concentración de glucógeno en la glándula digestiva y la presión osmótica como respuesta a la temperatura y al ciclo de muda.

24 horas antes de realizar el muestreo los organismos se pusieron en ayuno, de acuerdo a lo establecido por Rosas *et al.* (2002b).

12.2 MUESTREO DE LOS ORGANISMOS

Para obtener las muestras para evaluar la actividad enzimática y los metabolitos sanguíneos fue necesario reducir el metabolismo de los organismos, esto se logró disminuyendo la temperatura del agua 5°C con respecto a las temperaturas experimentales 30 minutos antes de ser muestreados.

La extracción de la hemolinfa¹ se hizo con una jeringa hipodérmica, previamente tratada con SIC-EDTA, el cual funciona como anticoagulante, la aguja se introdujo en la parte ventral del camarón en donde corre el cordón nervioso sitio donde se encuentra un importante depósito de hemolinfa (Figura 32).



Figura 32. Extracción de hemolinfa.



Figura 33. Manejo de muestras para las evaluaciones bioquímicas.

Una vez que se extrajo la hemolinfa se colocó sobre una porción de película parafilm® (dispuesta sobre una bolsa de gel refrigerante, para mantener la muestra en frío). Inmediatamente después se tomaron submuestras para evaluar los metabolitos sanguíneos (glucosa, hemocianina) así como la presión osmótica (Figura 33).

¹ Pascual *et al.* (2003) utilizan el término sangre y hemolinfa como sinónimos.

Para evaluar la hemocianina se diluyeron 10 μL de muestra en 990 μL de agua destilada en una celda para espectrofotómetro, se leyeron las absorbancias a 335 nm.

La concentración de hemocianina (oxyHc) se calculó utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon = 17.26$:

$$\text{oxyHc}_{(\text{mmol} / \text{L})} = (\text{Absorbancia} / 17.26) * F.D.$$

Donde F. D. es el factor de dilución (Chen y Cheng, 1993).

La presión osmótica (PO) se midió en un micro-osmómetro (American Advanced Instruments). Se obtuvo la PO de los organismos y la PO del medio externo (para cada temperatura), con estos datos se calculó la capacidad osmótica (CO), (Charmantier *et al.*, 1989).

$$\text{capacidad osmótica}_{(\text{mOsm} / \text{kg})} = \text{po del organismo} - \text{po del medio externo}$$

La concentración de glucosa se cuantificó mediante el uso de un kit comercial, Bayer-Sera-Pak Plus B01 4509-01.

Inmediatamente después de obtener las muestras de hemolinfa, se registraron las medidas morfométricas y ponderales de cada uno de los organismos. Finalmente los organismos se disecaron para obtener los hepatopáncreas en los que se evaluó el glucógeno y la actividad enzimática.

El hepatopáncreas se extrajo mediante una incisión en el cefalotórax, se pesó en una balanza analítica (Sartorius® ± 0.1 mg) y se tomó una submuestra de 0.02 a 0.06 g la cual se colocó en un tubo Eppendorf con ácido tricloroacético (TCA) para evaluar el glucógeno, el resto del hepatopáncreas se colocó en otro tubo Eppendorf. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido, posteriormente se transfirieron a un congelador -40 °C en donde se mantuvieron hasta su procesamiento.

De cada camarón se extirpó uno de los urópodos (Figura, 34) situados en la parte interna del telson, la muestra se colocó en un portaobjetos para determinar el estadio de muda al microscopio estereoscópico (Figura 35).

La clasificación del estadio de muda se realizó de acuerdo con Drach y Tchernigovtzeff (1967) revisado por Aquacop et al. (1975) para camarones penidos



Figura 34. Obtención del urópodo para determinar el estadio de muda.

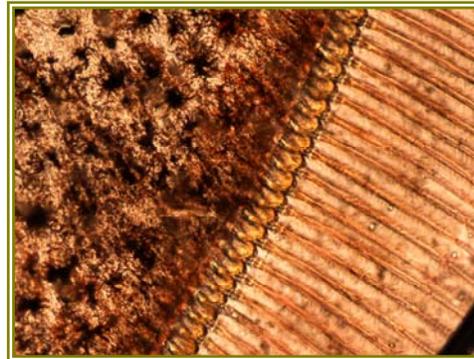


Figura 35. Vista microscópica de un urópodo. La fotografía fue proporcionada por la Dra. Gabriela Gaxiola.

12.3 EVALUACIÓN DE GLUCÓGENO

El corte del hepatopáncreas contenido en el tubo Eppendorf con TCA se homogeneizó y posteriormente se centrifugó a 7000 rpm durante 6 minutos. Se obtuvieron 100 μ L del sobrenadante los cuales se colocaron en otro tubo Eppendorf al cual previamente se le había agregado 500 μ L de etanol al 95%, se homogeneizó la mezcla. A continuación se incubó en una estufa a 37°C por 3 horas, al final de este periodo se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante, el exceso de éste se eliminó invirtiendo los tubos sobre papel absorbente. Se adicionaron 200 μ L de fenol al 5%, posteriormente 1 mL de ácido sulfúrico y se agitaron en un vórtex, se dispensaron 200 μ L de cada una de las muestras en una microplaca de lector de ELISA, incluyendo un blanco y un estándar. Las absorbancias se leyeron a 400 nm.

El cálculo de la concentración de glucógeno en la glándula digestiva se realizó de acuerdo a la siguiente expresión (Dubois *et al.*, 1965):

$$\text{glucógeno (mg / g)} = \left[\frac{D.O \text{ promedio} - D.O \text{ blanco}}{D.O \text{ estándar} - D.O \text{ blanco}} \right] [D.O \text{ estándar} - D.O \text{ blanco}] \left[\frac{\text{Vol. extracto}}{\text{peso del tejido}} \right] [0.9]$$

12.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

12.4.1 PREPARACIÓN DEL HOMOGENADO.

Se registró el peso del hepatopáncreas y se agregaron 500 μL de agua libre de pirógenos a un tubo Eppendorf que contenía el tejido. Se homogeneizó el tejido (el tubo Eppendorf con el tejido se mantuvo durante todo el proceso en frío (4°C). El homogenado resultante se centrifugó a 13200 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante recuperado constituye el *homogenado crudo* a partir del cual se hicieron dos diluciones en tubos Eppendorf:

a) dilución 1:10 (100 μL del sobrenadante y 900 μL de agua libre de pirógenos).

B) dilución 1:100 (10 μL del sobrenadante y 990 μL de agua libre de pirógenos).

12.4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA

Para evaluar la actividad de la tripsina, en una celda para espectrofotómetro se adicionaron 940 μL de buffer TRIS 0.1 M, y 10 μL de BAPNA 100 mM, homogeneizando; a continuación la celda se colocó en el espectrofotómetro, después se adicionaron 50 μL de extracto crudo y se volvió a mezclar., el vial se colocó nuevamente en el espectrofotómetro y se calibró a cero.

Se registraron las absorbancias en los minutos 1 y 2.

La actividad enzimática de la tripsina se calculó de acuerdo a la siguiente expresión (Bernfeld, 1955):

$$\text{Tripsina (U / mg de proteína)} = \left[\frac{\text{diferencia de absorbancias}}{1.02} \right] (\text{alícuota}) (\text{factor de dilución})$$

12.4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA α -AMILASA.

Para cada una de las muestras se utilizó un tubo de ensaye de 4mL al cual se le agregaron 100 μ L de glucógeno de ostión 1.5 % diluido en Buffer. Los tubos se colocaron en un baño a 37°C, de manera sincrónica (10 segundos) se colocaron 50 μ L de muestra. Las muestras se agitaron y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregaron 200 μ L DSA y la muestra se agitó y se colocó en agua a 100 °C durante 5 minutos exactamente. Finalmente se agregaron 2mL de agua, y las muestras se leyeron a 540 nm en un lector de ELISA.

La actividad de la α -amilasa se calculó de acuerdo a la siguiente expresión (Bernfeld, 1955):

$$\alpha - \text{amilasa} (U / \text{mg de proteína}) = \left[\frac{\left[\frac{(\overline{D.O \text{ de muestras}} - \overline{D.O \text{ del blanco}}) + 0.0314}{0.3076} \right] (0.05^{-1})(100)}{5} \right]$$

12.4.4 EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS.

Debido a que la actividad enzimática se expresa en unidades de proteínas, también fue necesario evaluar la cantidad de proteínas en la glándula digestiva.

La evaluación de proteínas se realizó utilizando el kit Bio-Rad Protein Assay.

12.5 ANÁLISIS DE DATOS

El número de organismos al final del experimento con los cuales se realizaron los análisis estadísticos se redujo a 51 debido a los estadios de muda que estaban representados en cada tratamiento, es importante señalar que los organismos que se encontraron en los diferentes subestadios de B se agruparon para aumentar el número de muestras, para realizar los análisis estadísticos.

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de un análisis de varianza bifactorial de 3 X 4 (tres para el factor temperatura y 4 para el factor estadio de muda) para evaluar la respuesta sinérgica de la temperatura y del estadio de muda. Cuando se presentaron diferencias significativas en alguno de los factores principales o en la interacción entre estos, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Bonferroni. Previo a la aplicación de estas dos pruebas se verificó la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos.

Los resultados de proteínas fueron transformados ($\log X+1$) para cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas para poder aplicar el análisis de varianza.

El nivel de probabilidad con el que se trabajó fue del 0.05. Los análisis estadísticos se realizaron en el software de análisis STATISTICA.

13. RESULTADOS

13.1 TEMPERATURA EN EL SISTEMA EXPERIMENTAL.

Durante el tiempo que duró el experimento, la temperatura se mantuvo como se muestra en la figura 36. El promedio de temperaturas para el intervalo inferior se mantuvo en 26 ± 0.08 °C, por su parte la temperatura óptima se mantuvo en 29 ± 1.1 °C y la temperatura del límite superior, se mantuvo en 32 ± 1.2 °C.

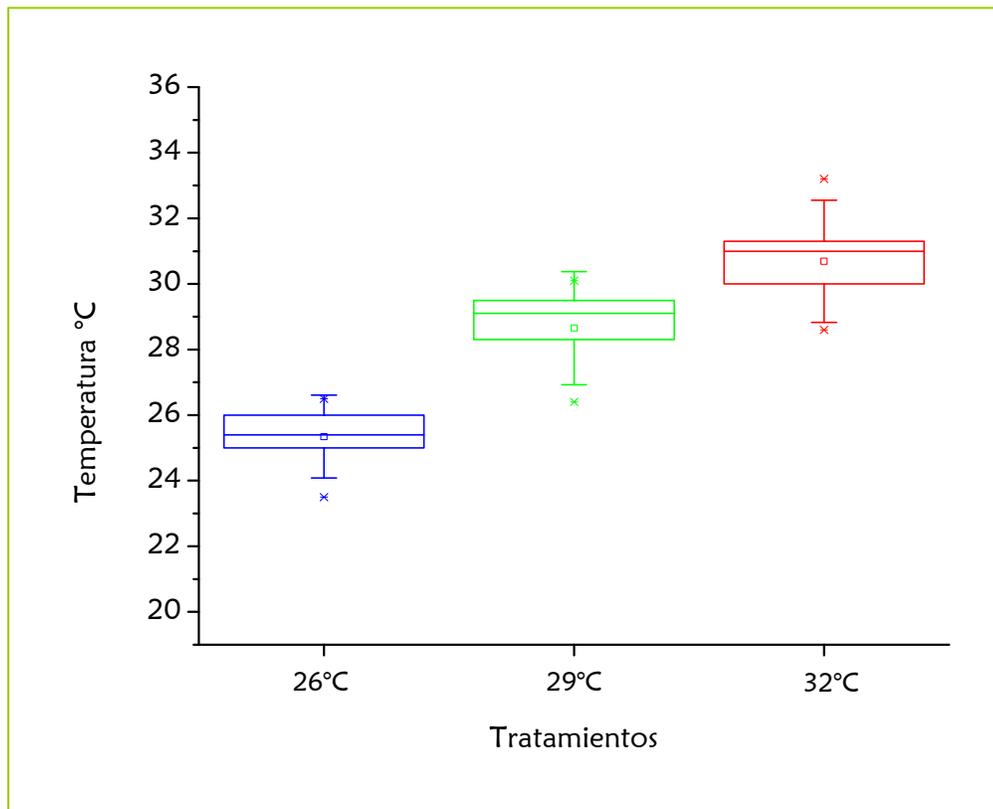


Figura 36. Variación de la temperatura (°C) en el sistema experimental durante el periodo experimental (30 días). □ Media \pm desviación estándar \pm intervalo de confianza al 95%

13.2 PRESIÓN OSMÓTICA.

Las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk, $p= 0.6204$) y de homogeneidad de varianzas (Hartley, Cochran y Bartlett, $p= 0.9113$) fueron no significativas. El análisis de varianza (Tabla 3) no mostró interacción entre el ciclo de muda y la temperatura sobre la capacidad osmótica ($p>0.05$). El anova sólo fue significativo para el factor estadio de muda (Figura 37).

Tabla 3. Análisis de varianza bifactorial de la capacidad osmótica en función de la temperatura y estadio de muda.

Efecto	Suma de cuadrados	grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Intercepto	2478199	1	2478199	1848,664	0,000000
Temperatura	302	2	151	0,113	0,893771
Estadio de muda	35101	3	11700	8,728	0,000157
Temperatura*Estadio de muda	9720	6	1620	1,209	0,323195
Error	50940	38	1341		

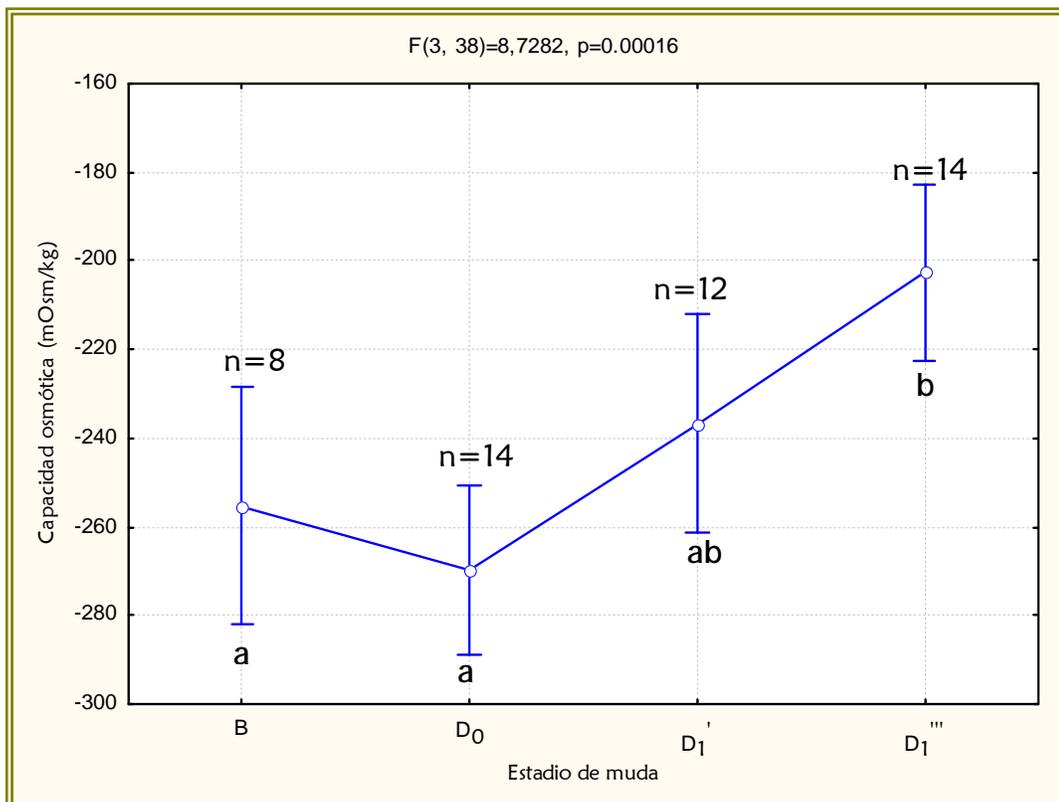


Figura 37. Variaciones de la capacidad osmótica en función del estadio de muda. Las barras denotan el intervalo de confianza al 95%. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

13.3 HEMOCIANINA

En relación con la hemocianina circulante en la hemolinfa, debido a que los resultados obtenidos, no presentaron normalidad ni homogeneidad de varianzas, no fue posible aplicar el ANOVA bifactorial, por lo que se utilizó el ANOVA por rangos de Kruskal Wallis para evaluar por separado el efecto de la temperatura y de la muda. En relación con la temperatura, no se encontraron diferencias significativas ($H(3, N=51)=5.76$ $p=0.124$), pero para el factor estadio de muda el ANOVA sí señaló diferencias significativas ($H(4, N=51)=18.912$ $p=0.0008$). Para ponderar las diferencias encontradas en relación con la muda se aplicó la prueba no paramétrica de comparación por pares de Wilcoxon (Figura 38). Los resultados de la prueba indicaron que la concentración de hemocianina circulante resultó significativamente más elevada en el estadio D_1' , mientras que los valores significativamente menores se encontraron en los estadios B y D_0 ($p<0.05$).

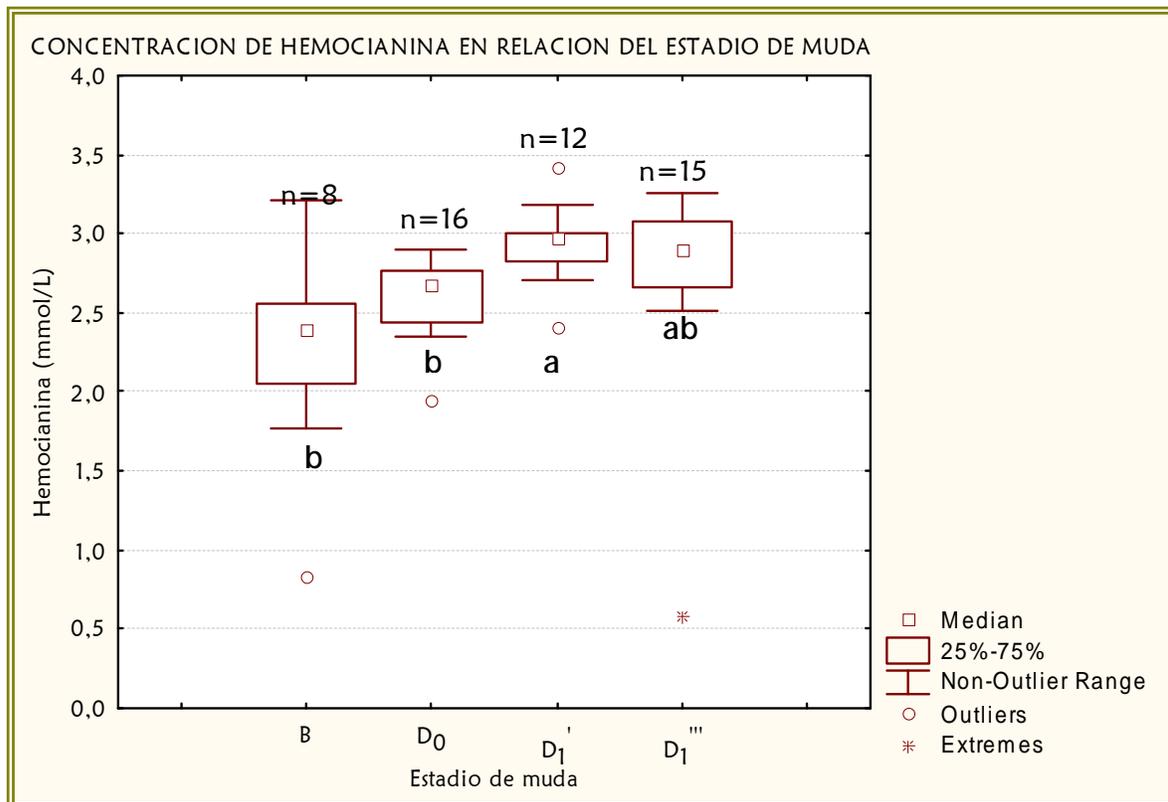


Figura 38. Variaciones de la concentración de hemocianina en función del estadio de muda. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

13.4 GLUCOSA

Los resultados de la concentración de glucosa circulante en sangre se distribuyó normalmente (Shapiro-Wilks, $p=0.1123$) y las varianzas fueron homogéneas (Hartley, Cochran y Bartlett, $p= 0.5166$).

La concentración de glucosa (Tabla 4) no tuvo una respuesta diferencial ante la temperatura y el ciclo de muda ($p > 0.05$).

Tabla 4. Análisis de varianza bifactorial de la concentración de glucosa en sangre de *L. vannamei* en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.

Efecto	Suma de cuadrados	grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Intercepto	4,375450	1	4,375450	267,5198	0,000000
Temperatura	0,012350	2	0,006175	0,3775	0,688162
Estadio de muda	0,009429	3	0,003143	0,1922	0,901069
Temperatura*Estadio de m	0,112709	6	0,018785	1,1485	0,354403
Error	0,605158	37	0,016356		

13.5 GLUCÓGENO.

Las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilks, $p= 0.150$) y de homogeneidad de varianzas de los resultados de glucógeno en la glándula digestiva (Hartley, Cochran y Bartlett, $p= 1.13$) fueron no significativas.

Se evidenció la interacción del ciclo de muda y la temperatura (Figura 39) sobre la concentración de glucógeno en hepatopáncreas (ANOVA, $p<0.05$). La concentración más alta se encuentra en la temperatura de 26°C y el subestadio de muda D₀.

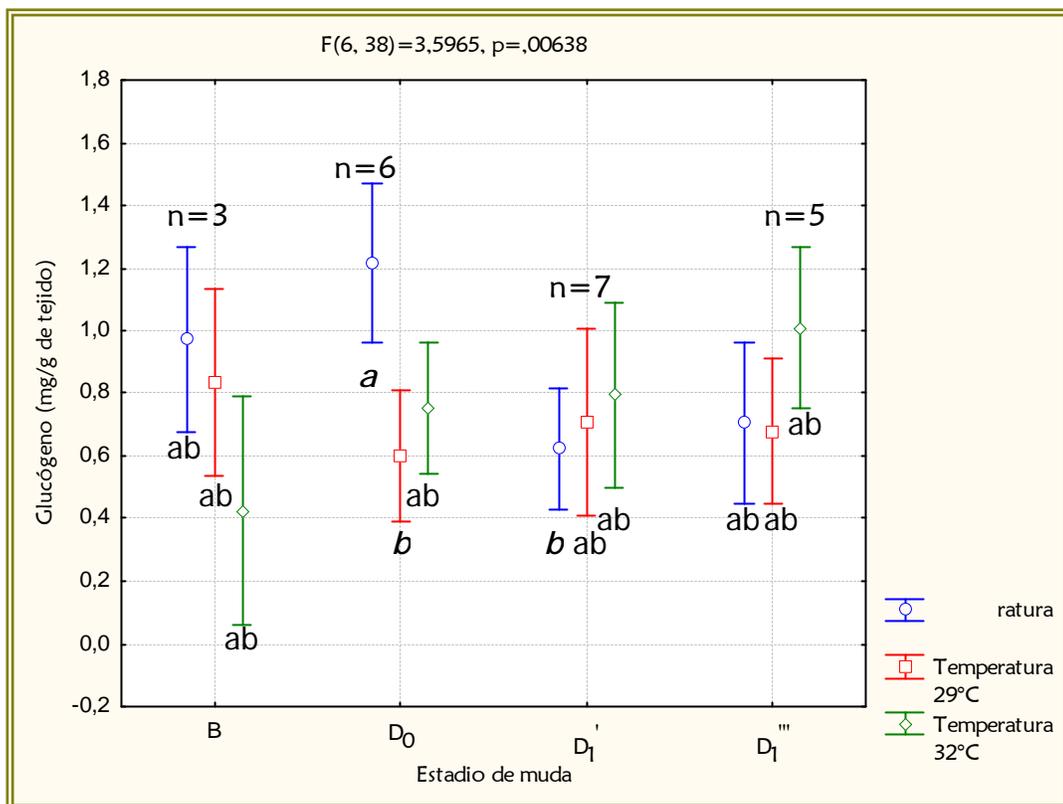


Figura 39. Concentración de glucógeno en glándula digestiva de *L. vannamei* en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda. Las barras denotan el intervalo de confianza al 95%. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

13.6 PROTEÍNAS

Los resultados de proteínas en hepatopáncreas, después de transformarlos se distribuyeron normalmente (Shapiro-Wilk, $p= 0.35447$) y las varianzas fueron homoscedásticas ($p=0.739149$). El análisis de varianza (Tabla 5) no evidenció una interacción significativa entre la temperatura y los estadios de muda sobre las proteínas de la glándula digestiva ($p>0.05$). El anova (Figura 40) sólo fue significativo para el factor estadio de muda ($p<0.05$).

Tabla 5. Análisis de varianza bifactorial de la concentración de proteínas solubles en hepatopáncreas *L. vannamei* en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Intercepto	13,66201	1	13,66201	666,6485	0,000000
Temperatura °C	0,04721	2	0,02361	1,1518	0,326570
Estadio de muda	0,34831	3	0,11610	5,6654	0,002547
Temperatura °C*Estadio de muda	0,06346	6	0,01058	0,5161	0,792451
Error	0,79925	39	0,02049		

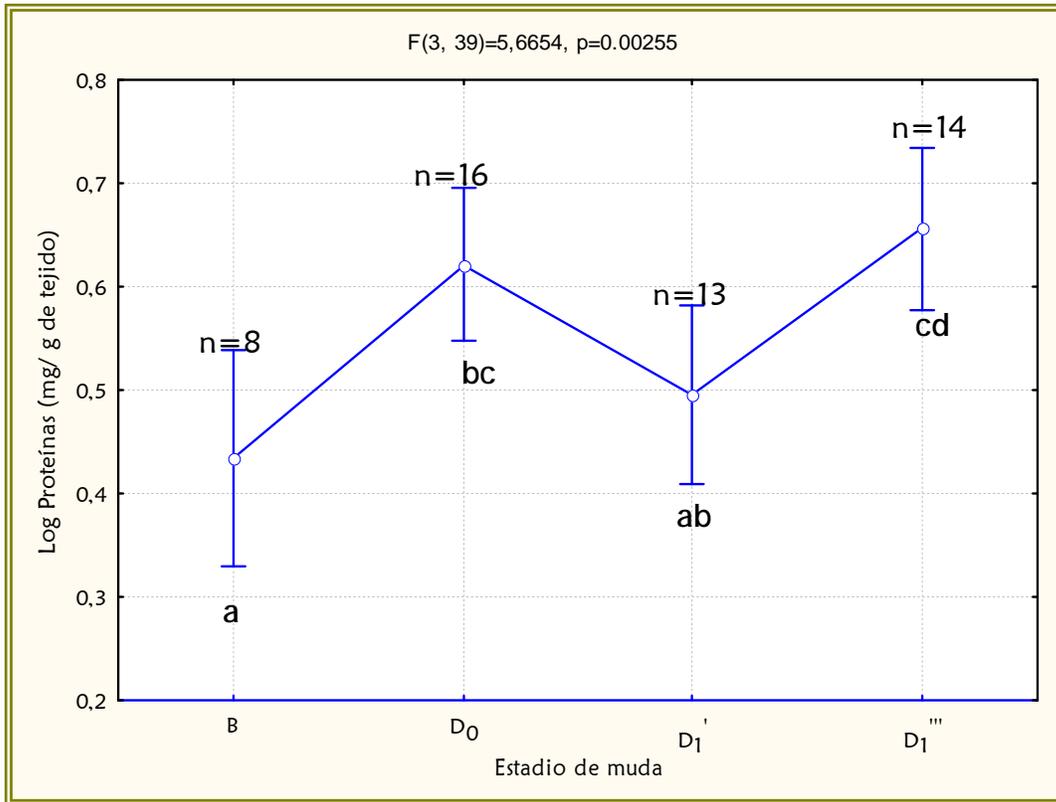


Figura 40. Concentración de proteínas (log X+1) en glándula digestiva de *L. vannamei* en diferentes condiciones estadios de muda. Las barras denotan el intervalo de confianza al 95%. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

13.7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Los resultados de la actividad de la tripsina se distribuyeron normalmente (Shapiro-Wilk, $p=0.17035$) y las varianzas fueron homocedásticas (Hartley, Cochran y Bartlett, $p= 0.9639$). La prueba de ponderación de las medias, no arrojó diferencias significativas, por lo que ni la temperatura, ni el factor muda, ni su interacción tuvieron un efecto significativo sobre la actividad de esta enzima ($p>0.05$, Figura 41)

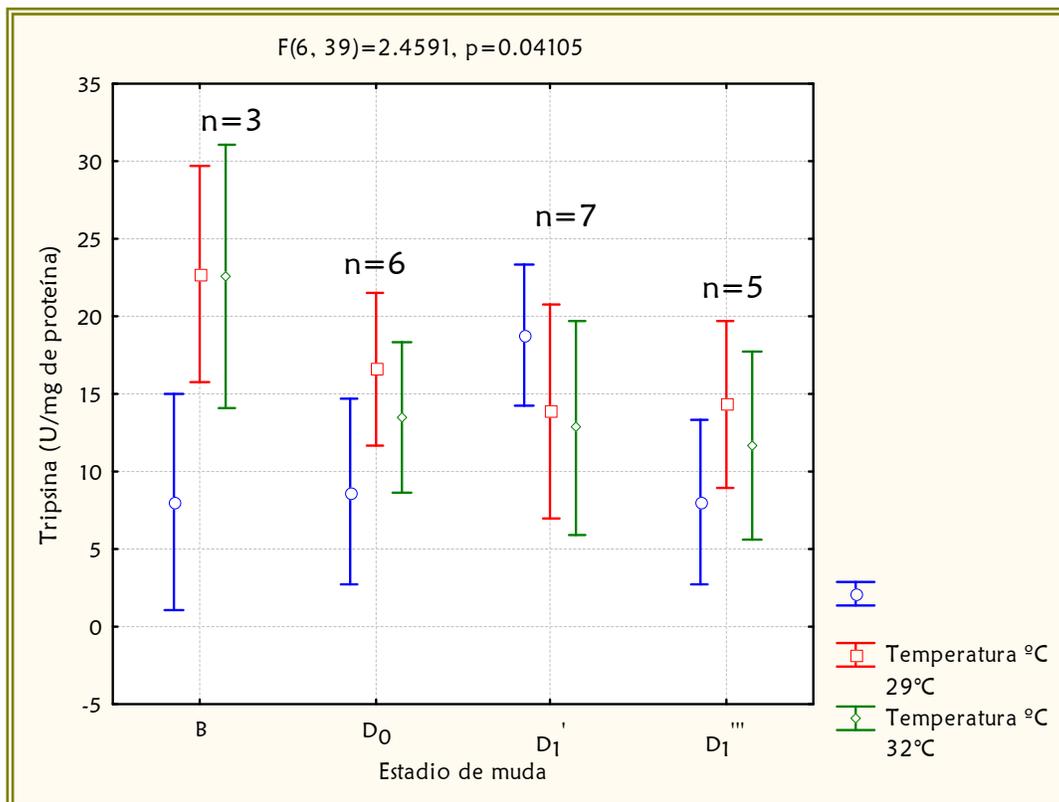


Figura 41. Actividad enzimática de la tripsina de *L. vannamei* en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda. Las barras denotan el intervalo de confianza al 95%.

Con respecto a la actividad de la α -amilasa los resultados se distribuyeron normalmente (Shapiro-Wilk, $p=0.35447$) y las varianzas fueron homocedásticas (Hartley, Cochran y Bartlett, $p= 0.73$).

El análisis de varianza (Tabla 6) no mostró interacción entre el ciclo de muda y la temperatura sobre la actividad de la α -amilasa ($p>0.05$). El anova sólo fue significativo para el factor estadio de muda (Figura 42). La actividad más alta de la α -amilasa se obtuvo para los organismos que estuvieron en el estadio B y la más baja en el subestadio D₁'''.

Tabla 6. Análisis de varianza bifactorial de la actividad enzimática de la α -amilasa de *L. vannamei* en diferentes condiciones de temperatura y según los estadios de muda.

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
	Intercepto	55332,00	1	55332,00	268,8750
Temperatura °C	617,23	2	308,61	1,4996	0,236463
Estadio de muda	2113,40	3	704,47	3,4232	0,026969
Temperatura °C*Estadio de muda	1006,88	6	167,81	0,8155	0,564914
Error	7614,26	37	205,79		

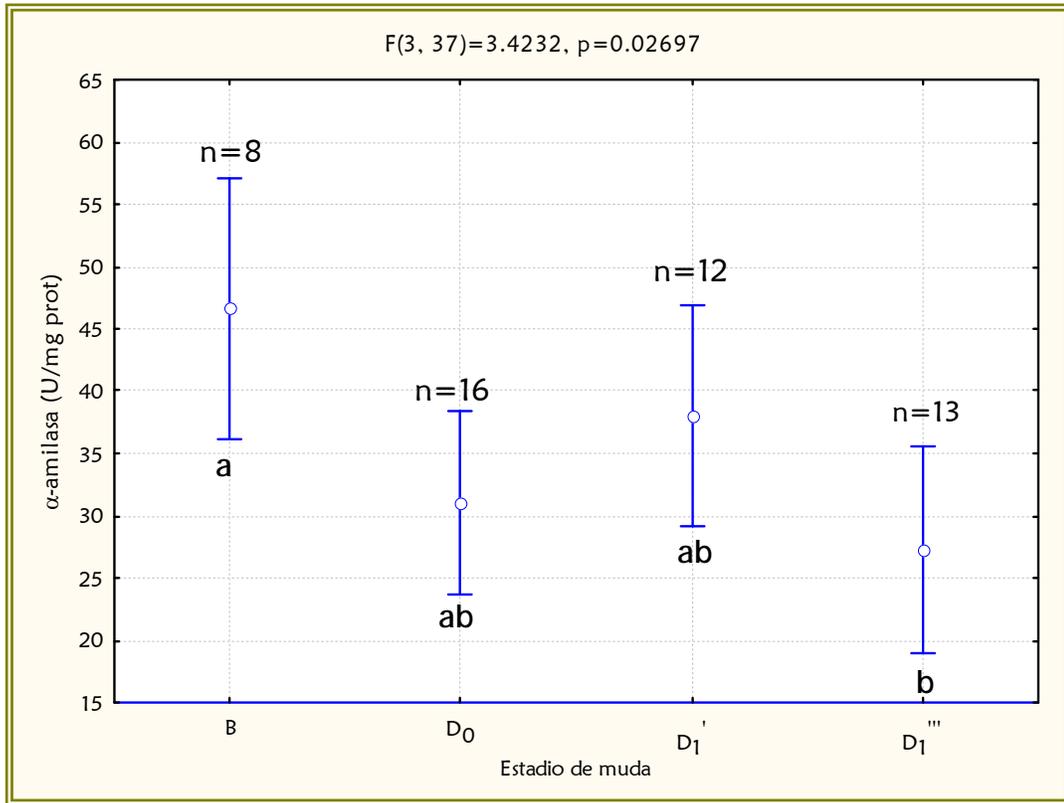


Figura 42. Actividad enzimática de la α -amilasa de *L. vannamei* en diferentes estadios de muda. Las barras denotan el intervalo de confianza al 95%.

14. DISCUSIÓN

La osmorregulación es un mecanismo importante de adaptación en las especies acuáticas particularmente en los crustáceos (Péqueux, 1995) debido al proceso de muda. en el momento de la ecdisis, cuando los organismos liberan su exoesqueleto, bombean agua del ambiente para aumentar su volumen alterando su medio interno.

Dentro del preferendum térmico, el crecimiento y la frecuencia de muda se incrementan en función de la temperatura, incrementándose también el requerimiento metabólico de energía para la osmorregulación y el crecimiento (Gong *et al.*, 2004).

La interacción de la temperatura y del ciclo de muda sobre la capacidad osmótica en este estudio no fue significativa, los efectos de estos dos factores se han analizado por separado para otras especies. Lemaire *et al.* (2002) encontraron para *Penaeus stylirostris*, que la capacidad osmótica mostró respuesta al estrés térmico. Estos autores reportan que cuando la temperatura se reduce (de 28 a 17°C) la capacidad osmótica tiende a disminuir. Lemaire *et al.* (2002) reportan que, cuando hay una disminución en la temperatura, la regulación osmótica de los organismos subadultos es más eficiente que la de los juveniles de *Penaeus stylirostris*. Dado que este estudio se realizó con juveniles de *L. vannamei*, es posible suponer que los mecanismos de regulación osmótica presenten ese patrón con respecto a la edad del organismo.

La capacidad osmótica de los organismos en los diferentes estadios de muda representados en este estudio concuerda con lo reportado por Galindo (2007). A partir de la postmuda tardía (B), la capacidad osmótica disminuye hacia la premuda temprana ($D_0 - D_1$).

Se ha demostrado que la capacidad hipo-osmorreguladora en *L. stylirostris* es más eficiente en la intermuda y declina en la premuda. Inmediatamente después de mudar, los juveniles presentan un punto iso-osmótico antes y después de la ecdisis (Ferraris *et al.* 1987).

El efecto sinérgico de temperatura y del ciclo de muda sobre la concentración de la hemocianina no se presentó. Los resultados obtenidos para los estadios del ciclo de

muda coinciden con los reportados por Galindo (2007), las concentraciones más bajas se dan en la postmuda (B) y las concentraciones más altas se dan en la premuda. Este comportamiento se atribuye al efecto dilución de la hemocianina en el momento en el que el agua del medio externo es bombeada hacia el interior del camarón (Cheng, *et al.*, 2002, Galindo, 2007). Cheng *et al.* (2001) encontraron diferencias significativas en la concentración de hemocianina en *Macrobrachium rosenbergii* dependientes del ciclo de muda, si bien no hay diferencias en todo el ciclo, hay un pico máximo en D₁, las concentraciones más bajas se encontraron en A y B.

Con respecto a las concentraciones de glucosa sanguínea en *L. vannamei*, el efecto de la temperatura y el ciclo de muda no fue significativo. No se presentó patrón alguno que permita considerar esta variable como un indicador del estrés térmico. Rosas *et al.* (2002b), establecieron una concentración de referencia para juveniles de esta misma especie de 0.33 ± 0.2 mg/mL. En el presente estudio las concentraciones medias para las temperaturas estuvieron cercanas a este valor.

El comportamiento de los resultados tampoco evidenció que las concentraciones de glucosa sanguínea estuvieran en relación con el estadio de muda, contrario a lo que Chan *et al.* (1988) reportaron para organismos de la misma especie. Los cambios en los niveles de glucosa en sangre en *L. vannamei* fueron bajos durante los estadios A y B y aumentaron gradualmente durante el estadio C, hasta alcanzar una máxima concentración en la proecdisis temprana (D₀ y D₁').

Para el caso del glucógeno hepatopancreático si se encontró un efecto del ciclo de muda y de la temperatura sobre su concentración. Desde el punto de vista del ciclo de muda, Galindo (2007) reporta que a partir de la premuda temprana (D₁' y D₁''') la concentración de glucógeno aumenta, lo que indica que el organismo está iniciando la formación de la nueva cutícula (Rosas *et al.*, 1995). Este comportamiento de los resultados también se observó para este estudio para las temperaturas de 29 °C y 32°C, sin embargo para la temperatura de 26°C después de la postmuda (B) el organismo sigue aumentando el glucógeno en hepatopáncreas, después consigue seguir el mismo patrón que las otras dos temperaturas.

Cadena (2000) encontró para *Litopenaeus vannamei*, una alta concentración de glucógeno en los estadios A, D₁ y D₃, lo que coincide con los resultados de Galindo (2007) para los estadios D₁ y D₃, mientras que para el estadio A, reporta la menor concentración de glucógeno, esto se le atribuye a que el organismo ha utilizado todas las reservas para la ecdisis. El comportamiento de la interacción de la temperatura y el ciclo de muda sobre las concentraciones de glucógeno para este trabajo no se pudo analizar completamente debido a la falta de representación de los estadios completo del ciclo de muda.

Con relación a la concentración de proteínas solubles en glándula digestiva, la interacción de la temperatura y el ciclo de muda no fue significativa. Sin embargo se observó que el ciclo de muda tiene un efecto significativo sobre la concentración de proteínas solubles. En la postmuda tardía (B) las concentraciones son más bajas que en premuda (D₀, D₁', D₁''') lo que puede indicar que los organismos después que han presentado el evento de muda, comienzan a exportar proteína hacia el músculo para su crecimiento. En premuda los organismos reservan proteínas para enfrentar la ecdisis. La respuesta obtenida en este trabajo coincide con Chan *et al.* (1988) quienes evaluaron la concentración de proteína soluble en la hemolinfa de *L. vannamei* y reportaron que la proteína empieza a decrecer desde la postmuda temprana (A), incrementándose en la intermuda hasta alcanzar un pico máximo en la premuda (D₀) a partir del cual se mantiene constante hasta la premuda tardía (D₂).

Con respecto a la actividad de la tripsina la interacción de la temperatura y del ciclo de muda no fue significativa. La tripsina en *L. vannamei* tiene actividad en un amplio intervalo de temperatura (Le Moullac 1994) que influyo para que no se observará alguna respuesta a este factor en el presente trabajo. Sin embargo a pesar que Van Wormhoudt (1974) demostró que en *Palaemon serratus* que las variaciones enzimáticas digestivas durante el día y durante el ciclo de muda se mantienen incluso en condiciones de ayuno, en este estudio, la actividad de la tripsina no respondió a este factor, esto puede estar relacionado con los estadios evaluados, es decir no se evaluó el ciclo completo de muda.

El análisis aplicado a los resultados de la α -amilasa permitió observar el patrón descrito por Casillas-Hernández *et al.* (2002) para (*Litopenaeus stylirostris*), en los

estadios representados en este estudio, a partir de la postmuda (B) empieza a descender mientras va avanzando hacia la premuda (D_0 , D_1' , D_1''). En *Litopenaeus stylirostris* la actividad enzimática permanece estable hasta el estadio D_2 y desciende en D_3 . Este comportamiento sugiere que la actividad de la amilasa se incrementa para la rápida hidrólisis de las reservas de carbohidratos y la producción de glucosa libre que puede ser usada como fuente primaria de energía para el metabolismo de compuestos requeridos, para el proceso de muda. Así mismo, Molina (2000) observó una mayor actividad de la amilasa en los estadios D_0 y D_2 y la menor actividad en D_3 durante el ciclo de muda. Sin embargo el efecto del ciclo de muda ligado al de la temperatura fue nulo.

El efecto sinérgico esperado para los metabolitos sanguíneos y actividad de las enzimas digestivas en juveniles de *L. vannamei* sólo se evidenció para la concentración de glucógeno en la glándula hepatopancreática, esto puede estar relacionado con la temperatura experimental en las cuales se evaluó la respuesta, ya que el intervalo corresponde con los límites del intervalo óptimo.

Durante el muestreo hubo organismos en todos los estadios del ciclo de muda: postmuda (temprana y tardía), intermuda, y premuda (temprana y tardía) sin embargo los análisis sólo se hizo para los organismos que se encontraron en postmuda tardía y en premuda temprana, debido a que no estuvieron representados todos los estadios en todos los tratamientos. Si bien las respuestas no se analizaron para todos los estadios del ciclo de muda los resultados parciales coinciden con la información disponible para investigaciones que tienen como punto central el ciclo de muda.

La importancia de la muda en los procesos fisiológicos en los crustáceos y la comprensión del proceso de la muda y la determinación precisa de los estados fisiológicos con referencia al ciclo de muda parece ser un prerrequisito previo a cada investigación fisiológica en estos organismos (Kuo y Lin, 1996). Es indudable que el ciclo de muda en crustáceos está caracterizado por diferencias en eventos morfológicos, fisiológicos y bioquímico (Chan *et al.*, 1988) tal y como se ha mostrado para algunos indicadores en este estudio.

Además del efecto nulo de la temperatura para este experimento, atribuido al hecho de que las temperaturas que se evaluaron pertenecen al preferendum térmico de

L. vannamei, es importante mencionar que no pueden descartarse efectos debidos al manejo de los organismos durante el muestreo.

El manejo de los organismo antes de la toma de muestras de sangre y de hepatopáncreas es crucial en este tipo se análisis, como varios autores lo han señalado e investigado (Pascual *et al.*, 2003; Sánchez, 2001). Se ha demostrado en un gran número de trabajos que la manipulación de los organismos puede alterar de manera significativa los componentes sanguíneos y por ello se ha establecido que previo a la extracción de la hemolinfa los organismos deben ser sometidos en un baño frío, 5°C por debajo de la temperatura experimental, con la finalidad de disminuir el metabolismo. Se ha demostrado que esta medida previene que algunos de los metabolitos plasmáticos, como la glucosa y el lactato, sean alterados rápidamente por la manipulación. En teoría se espera que los organismos respondan de la misma manera con respecto a la temperatura experimental cuando se reduzca en la misma magnitud la temperatura. Sin embargo, para experimentos en donde el factor a evaluar es la misma temperatura probablemente los organismos responden a la reducción brusca de la temperatura a la que se someten antes del muestreo, enmascarando el efecto de la temperatura en la que se mantuvieron durante la fase experimental.

15. CONCLUSIONES GENERALES

➤ La temperatura es un factor que controla el estado fisiológico de los organismos. Dentro del intervalo óptimo de temperatura de *L. vannamei*, no existieron diferencias significativas en la cantidad de alimento que ingieren los juveniles de esta especie, así como tampoco en las tasas de absorción medidas semanalmente. Sin embargo, en las mediciones realizadas al término del periodo experimental, estas respuestas fueron significativas con respecto a la temperatura. Es decir, la limitante impuesta por el diseño experimental en relación con el número de muestras tiene un efecto en la estimación de las respuestas.

➤ Existe una relación lineal entre la tasa de ingestión y el peso seco del organismo. A una temperatura de 29°C, la ecuación que describe esa relación para *L. vannamei* es:

$$y=0.4895x-0.8753$$

donde y es la tasa de ingestión (g/día) y X es el peso seco del organismo (g).

Ésta expresión se utilizó como parte de la parametrización del modulo de ingestión del modelo matemático de crecimiento de *L. vannamei*.

➤ Dentro del intervalo óptimo de temperatura, el crecimiento de *L. vannamei* en las distintas condiciones experimentales analizadas fue diferente. Se obtuvo un mayor crecimiento en el límite superior del intervalo (32 °C). Los organismos mantenidos en 26°C muestran un retraso en el crecimiento en peso cercano a dos semanas con respecto a los organismos mantenidos en 32°C. Dado que el mayor crecimiento de los organismos se presentó en el límite superior del intervalo óptimo es importante considerar que, en términos bioenergéticos, para que los organismos crezcan más, necesitan necesariamente incrementar la cantidad de

alimento que ingieren o la eficiencia de absorción para que sea transformado en biomasa.

🦋 El volumen del tracto digestivo puede ser un indicador de la saciedad. La metodología propuesta en este trabajo se puede utilizar para describir la relación entre esta variable y la repleción gástrica.

🦋 Dentro del preferendum térmico el medio interno de *L. vannamei* permanece estable. El efecto que ejerce el ciclo de muda sobre el medio interno es más importante que el de la temperatura como lo indican los cambios en la capacidad osmótica, concentración de hemocianina, proteínas y la actividad de la α -amilasa durante los diferentes estadios del ciclo. La nula respuesta de la concentración de glucosa y la tripsina ante el factor muda sugieren que los organismos también respondieron al estrés durante la manipulación durante el muestreo.

🦋 El modelo de crecimiento individual de *L. vannamei* hasta este momento está funcionando únicamente para la temperatura de 29°C y subestima el tamaño final de un organismo ya que predice un camarón de 30 g al final de un ciclo anual, datos experimentales evidencian que en este mismo tiempo un camarón pesa 50g.

Propuestas.

Es necesario completar el cálculo de tasas de ingestión para todo el ciclo de crecimiento, considerando que estas estimaciones deben estar asociadas a cada estadio de muda.

Para la estimación del volumen del tracto digestivo, es necesario que se complete la información para todos los intervalos de tamaño.

Para estimar la influencia de la temperatura en la actividad enzimática y en las concentraciones de los metabolitos es necesario considerar todos los estadios de muda. Así mismo, se sugiere buscar otras alternativas para el muestreo de los organismos, para no disminuir la temperatura experimental intempestivamente antes del muestreo.

16. REFERENCIAS



Adams, M. y Breck, J. E. (1990). Bioenergetics. *In*: Methods for fish biology. Ed. By C. B. Schreck and P. B. Moyle. American Fisheries Society, Bethesda Maryland. 389-415 pp.



Aguilar, M., Coutiño, B. B. y Salinas, R. P. (1996). Manual general de técnicas histológicas y citoquímicas. Facultad de Ciencias. UNAM.



Aldrich, D. V., Word, C. E y Baxter, K. (1968). An ecological interpretation of low temperature responses in *Penaeus aztecus* and *P. setiferus* postlarvae. Bulletin of Marine Science. **18**: 61-71.



Alcaraz G. (2000). Relevant stress indices in aquatic ecotoxicology. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. **16** (2): 75-81.



Alfonso, E., Ramos, L., Díaz-Iglesia, E., García, T. y Rosas, C. (1993). Manual del II curso internacional de producción de postlarvas de camarones peneidos del Atlántico de América. Campeche, México. 133 p.



Al-Mohanna, S. Y. y Nott, J. A. (1987). R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). Marine Biology. **95**: 129-137.



Arias, P. C. (2007). Factores que afectan la tasa de ingestión en camarones peneidos, una comparación de dos especies (*Litopenaeus setiferus* y *L. vannamei*). Tesis. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM.



Aquacop, Bourgeois, B. y Cuzón, G. (1975). Determination des stades d'intermude chez *Macrobrachium rosenbergii* (Caridae) and *Penaeus Merquinensis* (Penaeidae). Cnexo/COP, Internal Report. 40 pp.



















____): 253 - 272.



Mishra, A. K., Verdegam, M. y Dam, A. (2002). A dynamic simulation model for growth of Penaeid shrimps. *In*: Cruz- Suárez, L. E. Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola Cortés, M. G., Simões, N. (Eds). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.



New, M. B. (1976). A review of dietary studies with shrimp and prawn. *Aquaculture* 9:101-144.



Nunes, A. P. T., Goddard, S. y Gesteira, T. V. C. (1996). Feeding activity patterns of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*. 144: 371-386.



Nunes, A. P. T., Gesteira T. V. C. y Goddard, S. (1997). Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture*. 149: 121-136.



Nunes, A. J. y Parson, G. J. (1999). Feeding levels of the Southern Brown Shrimp *Penaeus subtilis* in Response to food dispersal. *Journal of the World Aquaculture Society*. 30:331-348.



Nunes, J. P. y Parson, J. G. (2000). Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture*. 187: 133-135.



Pascual, C., Zenteno, E., Cuzon, G., Suárez, J., Sánchez, A., Gaxiola, G., Taboada, G., Maldonado, T. y Rosas, C. (2004). *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary proteins. *Aquaculture*. **239**: 375-395.



Passano, L. M. (1960). Molting and its control. In: *Physiology of Crustacea*. Ed. T. H. Waterman. Vol. 1. 473-536 pp. Academic Press: New York.



Pérez-Farfante, I. y Kensley, B. (1997). Keys and diagnoses for the families and genera. Penaeoid and sengestoid shrimps and prawns of the world. *Mémoires du museum national d histoire naturelle*. 233pp.



Péqueux, A. (1995). Osmotic regulation in Crustaceans. *J. Crust. Biol.* **15**:1-60.



Piedrahita, R. H. (1988). Introduction to computer modeling of aquaculture pond ecosystems. *Aquaculture. Fish. Management*. **19**(1): 1-12.



Reymod, H y Largardère, J. P. (1990). Feeding Rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in Salt Marsh Ponds: Role of Halophilic Entomofauna. *Aquaculture*. **84**: 125-143.



Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo, J. y Lawrence, A. (1987). Practical Molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the world Aquaculture Society*. **18**(3): 180-185.





Rosenberry, B. (1996). World Shrimp Farming 1995. Shrimp News International, San Diego.



Rubino, A., Lawrence, A. y Zein-Eldin, P. (1983). The polyculture of *Penaeus stylirostris* Stimpson and *Penaeus aztecus* In tanks. Journal of the World Mariculture Society. 14:96-108.



Sánchez, A. A. (2001). Variables metabólicas de la hemolinfa, Respuesta inmune y balance energético de machos adultos de *Litopenaeus setiferus* durante la aclimatación (crustaceos, decápoda penaeidae). Tesis de Maestría. Biología de Sistemas y Recursos acuáticos. UNAM.



Secretaría de Agricultura y Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de la Pesca. Resumen Ejecutivo. Condición del recurso camarón en la sonda de Campeche y mar Caribe durante los primeros meses de la veda 2003 y perspectivas para la temporada de pesca 2003/2004. Septiembre 2003.



Secretaría de Agricultura y Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de la Pesca. Resumen Ejecutivo. Fundamento técnico para el establecimiento de vedas a la pesca de camarón en el golfo de México y mar Caribe (2004). Marzo, 2004.



Sedgwick, R. W. (1979a). Effects of ration size and feeding frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguensis* de Man. Aquaculture 16: 279-298.





17. ANEXOS

17.1. ANEXO I

Formulación de la dieta animal al 40 % de proteína[®].

Composición	Cantidad (%)
Harina de pescado	34
Harina de calamar	5
Caseína	12
CPSP90	4
Premex Vit	1
Robimix	0.45
Carofila	0.015
Colesterol	0.5
Lecitina	2
Aceite de bacalao	3.7
Almidón	20
Relleno	15.835
Alginato	1
Booster	0.5

17.2. ANEXO II

Metodología para el procesamiento histológico de los tractos digestivos (modificada de Morales, 2004)

1. Deshidratación de los órganos.
 - a. Fijación de las muestras en solución de Davidson (AFA, alcohol-formaldehído-ácido acético).
 - b. 2 baños separados de (1 hora cada uno) en alcohol etílico al 70%.
 - c. 3 baños separados de (1 hora cada uno) en alcohol etílico al 96%.
 - d. 3 baños separados de (1 hora cada uno) en alcohol etílico absoluto.
 - e. 3 baños separados de (1 hora cada uno) en clarene.
 - f. 3 baños separados de (1 hora cada uno) en parafina.

2. Técnica de tinción hematoxilina-eosina
 - a. Desparafinación de los cortes en xilol I durante 10 minutos.
 - b. Desparafinación de los cortes en xilol II durante 10 minutos.
 - c. Hidratación de los cortes en etanol absoluto durante 5 minutos.
 - d. Hidratación de los cortes en etanol al 96% durante cinco minutos.
 - e. Hidratación de los cortes en agua destilada durante 10 minutos.
 - f. Tinción de los cortes con hematoxilina durante 10 minutos.
 - g. Ponerlos al agua corriente durante 10 minutos.
 - h. Posteriormente se colocan en alcohol acidulado durante 3 minutos.
 - i. Se vuelven a colocar en agua corriente durante 10 minutos.
 - j. Tinción con eosina durante un minuto.
 - k. Deshidratación I con etanol al 96 % durante 2 minutos.
 - l. Deshidratación II con etanol absoluto durante 2 minutos.
 - m. Deshidratación III con etanol absoluto durante 5 minutos.
 - n. Los cortes histológicos se colocan en xilol durante 5 minutos.
 - o. Posteriormente se realiza el montaje con resina sintética al 60% en xilol.

17.3. ANEXO III

Determinación de glucógeno en la glándula digestiva del camarón (Dubois *et al.*, 1965).

- 🐚 Extraer la glándula digestiva.
- 🐚 Pesar en la balanza analítica la glándula completa, posteriormente se realiza un pequeño corte del tejido (pesar entre 0.0200-0.0600 g).
- 🐚 El corte se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le añadieron previamente 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 5%.
- 🐚 El tejido en TCA (5%) se homogeniza durante unos minutos.
- 🐚 Centrifugar a 7000 rpm durante 6 minutos.
- 🐚 El sobrenadante que resulta de la centrifugación se toman 100 μ L y se añaden en un tubo Eppendorf al cual se colocaron previamente 500 μ L de etanol al 95%. Con ayuda de la pipeta se homogeniza la mezcla.
- 🐚 Se incuba en una estufa a 37 °C por 3 horas.
- 🐚 Centrifugar a 7000 rpm por 15 minutos.
- 🐚 Desechar el sobrenadante y escurrir los tubos en forma invertida sobre un papel absorbente (*en este momento se preparan el blanco y estándar*).
- 🐚 Adicionar 200 μ L de fenol al 5%
- 🐚 Añadir 1 mL de ácido sulfúrico. Agitar en vórtex.
- 🐚 Dispensar 200 μ L por muestra (incluyendo el blanco y estándar) en una microplaca de lector de ELISA.
- 🐚 Leer la absorbancia a 400 nm.

17.4. TÉCNICAS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (BERNFELD, 1955).

Cada una de las series de las técnicas que integra la serie de evaluaciones enzimáticas combina la colorimetría con la incubación de la enzima y el sustrato. La actividad se expresa como actividad de la enzima por mg de proteína, por lo tanto, al evaluar cualquier enzima es necesario evaluar también las proteínas totales.

Unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato/minuto ($E=18000 \text{ L/mol/cm}$).

Obtención de la muestra.

- 🍽️ Extraer el tejido y congelarlo en nitrógeno líquido.
- 🍽️ Mantener en congelación (-40°C) hasta su procesamiento.

Preparación del homogenado

- 🍽️ Antes de iniciar el homogenado, pesar el hepatopáncreas, para lo cual se registra el peso del tubo con tejido y el peso del tubo sin tejido.
- 🍽️ Colocar el homogenado del hepatopáncreas en el tubo de vidrio del homogenizador y adicionar $500 \mu\text{L}$ de agua libre de pirógenos. Es importante homogenizar a 4°C , para lo cual se pone el tubo en un vaso de precipitado con hielo frappé. Se homogeniza hasta que se desbarate el tejido completamente (aproximadamente 30 seg).
- 🍽️ Vaciar el contenido en un tubo Eppendorf.
- 🍽️ Centrifugar a $13\ 200 \text{ rpm}$ por 20 minutos a 4°C .
- 🍽️ Vaciar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf.
- 🍽️ De este sobrenadante (homogenado crudo), se hacen dos diluciones en tubos Eppendorf:
 - se toman $100 \mu\text{L}$ del sobrenadante y se diluye en $900 \mu\text{L}$ de agua libre de pirógenos (dilución 1:10)
 - se toman $10 \mu\text{L}$ del sobrenadante y se diluyen en $990 \mu\text{L}$ de agua libre de pirógenos (dilución 1:100).
- 🍽️ Es importante agitar la diluciones en el vórtex antes de ser utilizadas.
- 🍽️ En todo momento las muestras deben manejarse en frío.
- 🍽️ Los homogenados se pueden almacenar en congelación (-40°C).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIPSINA.

Se evalúa directamente en el espectrofotómetro en 405 nm. Es una reacción rápida entre el sustrato y enzima. En este método el sustrato es el Benzoil-Arginine-paranitroanilide (BAPNA).

Sustrato: BAPNA 100 mM

Buffer: TRIS 0.1 M, pH 8, a 25 °C

Muestra: _extracto crudo.

PROTOCOLO.

- 🐚 Poner espectrofotómetro a 450 nm.
- 🐚 Añadir 940 μL de buffer TRIS 0.1 M, pH en una celda de 1 mL para espectrofotómetro.
- 🐚 Adicionar 10 μL de BAPNA 100 mM
- 🐚 Mezclar, tapando con papel parafilm.
- 🐚 Colocar en el espectrofotómetro
- 🐚 Adicionar 50 μL de extracto crudo y mezclar tapando con papel parafilm.
- 🐚 Volver a colocar el vial en el espectrofotómetro, y calibrar a cero.
- 🐚 Registrar los valores en los minutos 1 y 2.

Blanco: 940 μL buffer tris + 10 μL BAPNA (1mM)

Importante: todos los pasos de la técnica deben manejarse a 4°C.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA α -AMILASA.

Este método combina la colorimetría con la incubación de la enzima. El sustrato que se utiliza es el glucógeno de ostión 1.5%, la actividad de la amilasa es expresada en términos de maltosa liberada en el tiempo que dura la reacción de incubación a 37°C/mL de solución enzimática. La actividad es expresada como actividad amilásica/mg de proteína.

PROTOCOLO

- 🍽 En un tubo de ensaye de 4 mL agregar 100 μ L de glucógeno 1.5 % diluido en Buffer.
- 🍽 Colocar los tubos en el baño a 37°C.
- 🍽 Colocar de manera sincrónica (cada 10 ó 15 segundos) 50 μ L de muestra.
- 🍽 Agitar.
- 🍽 Incubar durante 10 minutos a 37 °C
- 🍽 Parar la reacción de manera sincrónica de la misma manera que se colocó el sustrato, 200 μ L DSA.
- 🍽 Agitar.
- 🍽 Cocinar a 100 °C durante exactamente 5 minutos
- 🍽 Agregar 2mL de agua.
- 🍽 Leer a 540 nm.