



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del nivel de proteínas en el crecimiento, condición fisiológica e inmune de un banco de reproductores de camarón blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus* (L).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IVÁN DAVID REGALADO PINEDA



Tutor: Carlos Rosas Vázquez

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

Formato
1.- Datos del alumno Regalado Pineda Iván David 56846035 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 400073994
2.- Datos del tutor Dr. Carlos Rosas Vázquez
3.- Datos del sinodal 1 Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez
4.- Datos del sinodal 2 Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés
5.- Datos del sinodal 3 Dr. Héctor Garduño Argueta
6.- Datos del sinodal 4 M. en C. María del Pilar Torres García
7.- Datos del trabajo escrito Efecto del nivel de proteínas en el crecimiento, condición fisiológica e inmune de un banco de reproductores de camarón blanco del Golfo de México <i>Litopenaeus setiferus</i> (L). 57 p 2008

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme disfrutar, aprender y vivir de todos los beneficios que ofrece la máxima casa de estudios, tener una formación integral y un ambiente académico.

A la Facultad de Ciencias por otorgarme a través de las instalaciones, el material y la gente que la conforma, las herramientas necesarias, el conocimiento y los valores para actuar ante la vida y ejercer con responsabilidad los conocimientos adquiridos durante mi trayectoria universitaria.

Al Dr. Carlos Rosas Vázquez por su apoyo, su tutela y camaradería para la realización en ésta tesis.

A la Dra. Cristina Pascual por su valioso apoyo y enseñanzas para la realización del presente trabajo. Por su apoyo con las evaluaciones en el laboratorio.

A la M. en C. Ariadna Sánchez por su paciencia, apoyo y comprensión, por permitirme aprender de su conocimiento. Por instruirme en las metodologías y análisis de datos, así como su invaluable ayuda en los muestreos y evaluaciones en el laboratorio

A Manuel Valenzuela, Miguel Arévalo y Luis Enrique Hidalgo por su invaluable ayuda en el mantenimiento y cuidado de los estanques .

A la Dra. Cecilia Vanegas por sus valiosos comentarios y críticas constructivas del presente trabajo, y por su apoyo incondicional.

A la Dra. Gabriela Gaxiola por su apoyo para nosotros los estudiantes, y por su valioso apoyo en la elaboración de las dietas para el presente estudio.

A la M. en C. Maria del Pilar por su apoyo como sinodal de mi tesis

Al Dr. Héctor Garduño por sus valiosas críticas al presente trabajo

En general a todo el personal de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, UNAM, Sisal, Yucatán, que con su apoyo incondicional logré sentirme como en casa en la Unidad y con un excelente ambiente de trabajo y camaradería. Por permitirme aprender infinidad de cosas de cada uno de ellos.

A la familia Chuc en Sisal, por acogerme como un hijo y apoyarme de manera incondicional en mi estancia.

A la familia Duran en Sisal, que me tomaron como parte de su familia y me llenaron de momentos maravillosos.

A mis profesores de la carrera, por la dedicación y el magnífico desempeño de ese gran compromiso que es el ser maestro, por sus enseñanzas, por compartir su sabiduría, su paciencia y comprensión, por su apoyo y amistad.

A mis compañeros por tantos momentos inolvidables con ellos, el apoyo, la hermandad, por compartir, por escuchar, por enseñarme, por compartir con migo su vida.

A la Q.F.B. Gloria Alicia Figueroa Aguilar, por sus valiosos comentarios y apoyo incondicional para la realización de mi trabajo de tesis

A Thamar por ser tan valiosa en mi vida, por compartir con migo tantos momentos, por su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado.

A mi familia, que han estado con migo toda mi vida, que su apoyo es incondicional, y que me han impulsado durante toda mi carrera

A mis padres que sin su apoyo me habría sido sumamente difícil lograr mis objetivos, mis metas y mi carrera, gracias por enseñarme a vivir, a salir adelante por mi cuenta, a luchar en ésta vida, gracias por su apoyo incondicional, su cobijo perpetuo, su confianza en mi y su comprensión.

A mi hermano por apoyarme en cada momento, por estar a mi lado siempre que lo he necesitado más, por esas pláticas de la vida, por todo el apoyo y enseñanzas que me ha brindado.

Dedicatoria

A ti papá, por ser esa gran persona en mi vida, mi ejemplo, mi maestro, mi amigo y compañero. Gracias por llenarme de tanto amor y comprensión, por darme el apoyo incondicional, por enseñarme que la vida es bella, gracias por siempre estar a mi lado, te amo papá.

A ti mamá por tu generosidad y apoyo incondicional, por tus enseñanzas, por tu dedicación a cuidarme, por tu cobijo, por enseñarme a ser cada día mejor, a ser ambicioso en la vida, por dedicar toda tu vida sin importar el esfuerzo o sacrificio a ver por tus hijos. Agradezco infinitamente todo lo que has hecho por mí, te amo.

A ti hermano, mi eterno amigo, toda una vida juntos, peleando, jugando, riendo, compartiendo nuestras vidas. Te agradezco todo tu apoyo, el que siempre estés a mi lado, por tu comprensión, por tantos momentos juntos.

A ustedes mi familia dedico mi esfuerzo, mi trabajo, mi dedicación, como un pequeño regalo del inmenso cariño que les tengo, los amo.

ÍNDICE

Resumen	4
1.- Introducción	5
1.1 Importancia de la acuicultura en México	5
1.2 Importancia del cultivo de <i>Litopenaeus setiferus</i>	6
1.3 Ventajas y desventajas del cultivo de la especie	6
1.4 La dieta en cautiverio y la importancia de las proteínas	7
1.5 Condición fisiológica e inmune	7
1.6 Calidad espermática	8
2.- Hipótesis	8
3.- Objetivo general	8
4.- Objetivos particulares	9
5.- Materiales y métodos	9
5.1 Origen de los organismos	9
5.2 Diseño experimental	9
5.2.1 Mantenimiento de los organismos y estanques al tiempo cero (T0)	9
5.2.2 Dietas experimentales, mantenimiento de los organismos y estanques al inicio del estudio	10
5.2.3 Periodo de Evaluaciones (T0, T1, T2 y T3)	10
5.2.4 Captura de los organismos para la evaluación	11
5.2.5 Análisis en el laboratorio	11
5.3 Preparación de la dieta	12
5.4 Evaluaciones en el laboratorio	13
5.4.1 Condición general	13
5.4.1.1 Extracción y separación de hemolinfa	14
5.4.1.2 Determinación de la presión osmótica	14
5.4.2 Parámetros fisiológicos	15
5.4.2.1 Parámetros sanguíneos	15
5.4.2.1.1 Obtención de la hemocianina	15
5.4.2.1.2 Bioquímica sanguínea	15
5.4.2.2 Bioquímica del hepatopáncreas y músculo	16
5.4.2.3 Índice hepatosomático	17

5.4.3 Condición inmunológica	17
5.4.3.1 Parámetros sanguíneos	17
5.4.3.1.1 Determinación de la actividad de la fenoloxidasa (FO) y la fenoloxidasa total	17
5.4.3.1.2 Hemaglutinación	18
5.4.3.1.3 Conteo de hemocitos	18
5.4.3.1.4 Determinación del estallido respiratorio	18
5.4.4 Calidad espermática	19
5.4.5 Análisis estadísticos	19
6.- Resultados	20
6.1 Indicadores petrológicos	20
6.1.1 Presión osmótica	22
6.2.- Indicadores Fisiológicos	23
6.2.1 Capacidad Osmótica (CO)	23
6.2.2 Proteínas, Hemocianina y relación Hemocianina/proteínas	24
6.2.3 Glucosa, lactato y glucógeno	26
6.2.4 Índice hepatosomático	29
6.2.5 Acilglicéridos, colesterol y lípidos	29
6.3.- Indicadores inmunológicos	32
6.3.1 Sistema fenoloxidasa y hemaglutinación	32
6.3.2 Estallido respiratorio basal y activado	34
6.3.3 Hemocitos	35
6.4 Calidad espermática	39

7.- Discusión	41
8.- Conclusiones	46
9.- Bibliografía	47
10.- Anexos	54

Índice de figuras

Fig. 1 Variaciones de peso en gramos (A) y talla en centímetros (B)	21
Fig. 2 Variación de la presión osmótica	22
Fig. 3 Capacidad osmótica	23
Fig. 4 Variación de las proteínas (mg/ml) (A), hemocianina (mg/ml) (B) y relación Hc/proteínas (mmol/l) (C)	25
Fig. 5 Variación en mg/ml de glucosa (A), lactato (B) y glucógeno en la glándula digestiva (C)	28
Fig. 6 Índice hepatosomático	29
Fig. 7 Datos de acilglicéridos (A), Colesterol (B), lípidos de la glándula digestiva (C) y del músculo (D)	31
Fig. 8 Fenol oxidasa en lisado de hemocitos (A) fenol oxidasa en plasma (FO) (B) y hemaglutinación (C)	33
Fig. 9 Estallido respiratorio basal (A) y activado (B)	35
Fig. 10 Hemocitos totales (A), células granulares (B), células semigranulares (C), granulares totales (D), y hialinas (E)	38
Fig. 11 Efecto de las proteínas en el alimento en la calidad espermática	39
Fig. 12 Proporción de células espermáticas	40
Fig. 10.1 Oscilación de temperatura y oxígeno en un periodo de 24 hrs	54
Fig. 10.2 Variación mensual de datos de oxígeno disuelto (A) y temperatura en °C (B)	55
Fig. 10.3 Datos de salinidad	56

Índice de tablas

Tabla 1 Diseño experimental completamente aleatorizado de la evaluación de 3 dietas experimentales (35%, 45% y 55% PC) en adultos de *L. setiferus* muestreados mensualmente por un periodo de cuatro meses (T0, T1, T2 y T3). 12

Tabla 2 Composición de las dietas experimentales (% total de ingredientes) 13

Tabla 10.1 Número de organismos machos y hembras adultos de *L. setiferus* evaluados en los distintos tiempos del periodo experimental (T0,T1,T2 y T3) 56

Tabla 10.2 Valores significativos ($P < 0.05$) resultado del análisis estadístico (ANOVA multivariado) de datos de camarones adultos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio. 57

Resumen

La importancia de la acuicultura en México ha tomado gran relevancia para el país, siendo una herramienta necesaria para la explotación de recursos alimenticios obtenidos del mar sin afectar directamente los ecosistemas marinos. El cultivo de camarón en México ha ido en aumento, debido a que la captura del camarón es la actividad pesquera que capta mayor entrada de divisas al país. La especie *L. setiferus* habita en el golfo de México, y es una especie con un gran potencial para su explotación, debido a su gran tamaño y buen sabor. Diversos estudios se han realizado en torno a la especie para poderla cultivar y pese a estos esfuerzos, no se ha podido resolver la incógnita sobre la degeneración del espermatóforo que sufren en cautiverio los machos de ésta especie, siendo esto un impedimento para cerrar el ciclo de vida en cautiverio. La alimentación de estos organismos varía durante todo su ciclo de vida, teniendo distintos requerimientos nutricionales en cada fase de ella. Es así como se planteó la administración de tres dietas con distinto porcentaje de proteína cruda PC (35, 45 y 55%) para los adultos reproductores de ésta especie. Se observó el efecto de las distintas dietas en el crecimiento, la condición fisiológica, inmune y reproductiva de la especie, esperando obtener una mejor respuesta en los animales alimentados con una dieta alta en proteína. Se relacionó el efecto de las dietas experimentales con los cambios observados en la condición fisiológica e inmune, obteniendo un mejor resultado en los animales alimentados con 55%PC. A pesar de esto, en ésta dieta y en la de 35%PC, no se encontró una mejor calidad reproductiva. Con la dieta 45% se obtuvo una buena condición inmune y el mayor número de células espermáticas normales, por lo que éste porcentaje de proteína en la dieta, se puede utilizar para obtener machos con una condición inmune buena y una buena calidad reproductiva, esto ayudará para obtener una mejora en el cierre del ciclo del camarón.

Efecto del nivel de proteínas en el crecimiento, condición fisiológica e inmune de un banco de reproductores de camarón blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus* (L).

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la acuicultura en México

En la actualidad los recursos marinos juegan un papel importante en la economía y la política internacional. Además de la explotación natural se ha desarrollado una sofisticada tecnología para dar apoyo a la producción acuícola como herramienta para abastecer los mercados de pescados y mariscos del mundo evitando afectar a las poblaciones silvestres con el consecuente deterioro del hábitat.

El crecimiento de la acuicultura en México ha permitido que aún cuando la actividad de captura va a la baja, se registre un crecimiento constante en el número total de toneladas obtenidas de diversos productos pesqueros incluido el camarón. En la actualidad, el cultivo de estos organismos contribuye con más del 20% de la producción total a nivel mundial. De las especies que son usadas para el cultivo, algunas de ellas han sido elegidas por su rápido crecimiento así como por su valor comercial, como es el caso de los camarones peneidos (Martinez *et al.*, 1998)

Por su volumen de captura el camarón ocupa el tercer lugar nacional, pero el primero en valor al captar el 44 % de la producción pesquera. México exportó en el 2004, 45 mil 300 toneladas de camarón, con un valor de 271 millones de dólares (www.sagarpa.gob , 2005)

El camarón blanco *Litopenaeus setiferus* es una de las especies de camarones peneidos que habitan el Golfo de México y la zona costera del océano Atlántico de Norte América. Esta especie se distribuye desde el sur de Nueva York en su límite norte, hasta la península de Yucatán (Muncy, 1984).

El ciclo de vida del camarón blanco del Golfo de México se inicia cuando los adultos se reproducen en la plataforma continental entre la isóbata de los 4 y los 40 m (Williams, 1984). Ahí los huevos fecundados quedan a merced de las corrientes marinas, donde 12 a 14 horas después eclosiona una larva nauplio que no se alimenta. Posteriormente y por un período de entre 12 a 15 días las larvas planctónicas se desarrollan, moviéndose hacia la costa en búsqueda de zonas de refugio en las lagunas costeras y los estuarios, donde arriban como postlarvas. Ahí los camarones son reclutados en las áreas salobres con vegetación sumergida, las cuales son utilizadas como áreas de crecimiento. En estas zonas los camarones pasan entre 7 a 9 meses, antes de migrar nuevamente al mar donde se reclutan como adultos (Chow *et al.*, 1993; King, 1948; Misamore y Browdy, 1996; Renaud, 1986; Rosas *et al.*, 1999, Zein-Eldin, 1986).

1.2 Importancia del cultivo de *Litopenaeus setiferus*

L. setiferus habita tanto en la zona estuarina como en la marina, y debido a su abundancia juega un papel ecológico importante, por lo que es necesario implementar fuentes alternativas que permitan, por un lado aminorar la presión que se ejerce sobre este organismo y su ambiente, tales como la sobrepesca, contaminación y destrucción de su hábitat; y por el otro aumentar su producción. (Rosas, C , 2004, citado en Margarita Caso *et-al*, 2004)

En el sur del Golfo de México la especie *L. setiferus* está expuesta a muy diversas presiones ambientales entre las cuales se incluyen la pesca excesiva, la contaminación de bahías, estuarios y lagunas costeras con pesticidas asociados con la agricultura, la generada por descargas de aguas negras de las ciudades costeras y la provocada por la industria petrolera (Balcom, 1994; Benitez y Bárcenas, 1996).

Bray y Lawrence (1992), consideraron que debido al deterioro cada vez mayor de la población silvestre de reproductores y la necesidad de completar el desarrollo de la biotecnología para *L. setiferus*, es necesario conocer las condiciones más adecuadas para cerrar el ciclo de vida del camarón blanco *L. setiferus* en condiciones controladas. El fin último es el de crear un banco de reproductores y proporcionar así una producción continua de larvas, postlarvas y juveniles de esta especie para el desarrollo de la camaronicultura de la región Sureste del Golfo de México.

1.3 Ventajas y desventajas del cultivo de la especie

El cultivo de *L. setiferus* tiene ciertas ventajas: es la tercer especie de mayor abundancia entre las especies de importancia comercial en el Golfo de México, posee un alto porcentaje de sobrevivencia (95-99%), una atractiva tasa de producción (más de 5000 kg/ha), puede llegar a pesos de 13.5 g/camarón y cultivarse en altas densidades (40 camarones/m²) (Sandifer *et al*, 1993). A su vez hay ciertos problemas por resolver para obtener un efectivo y eficaz cultivo de esta especie. En cautiverio se han observado dos síndromes en la respuesta reproductiva en los machos adultos de *L. setiferus*. En uno de ellos se desarrolla un proceso de melanización (respuesta inmunológica) en el ápula terminal, con un consecuente deterioro del espermatóforo que dificulta su transferencia a la hembra, por lo cual se le ha denominado como Síndrome de Melanización del Aparato Reprodutor (SMAR). Por otro lado, ocurre una disminución drástica en la cantidad de células espermáticas con un aumento en las células anormales y/o muertas, al cual se le llama Síndrome Degenerativo del Aparato Reprodutor de Machos (SDARM). Estos síndromes no solo se han presentado en esta especie, aunque sí con mayor número de casos. A pesar de que se han girado en torno a éstos varias investigaciones, aun no se sabe a ciencia cierta la causa (Brown *et al.*, 1979; Leung-Trujillo y Lawrence, 1987, Alfaro, 1990).

1.4 La dieta en cautiverio y la importancia de las proteínas.

Un factor que determina el éxito del cultivo de camarón, es el suministro de alimento adecuado para las diferentes etapas de su ciclo de vida. Los camarones son descritos como omnívoros detritívoros. Una evaluación del contenido estomacal reveló pedazos de camarones, poliquetos, bivalvos, ofiuridos, nematodos, restos de plantas, etc (Britton y Morton, 1989; Preston *et al.*, 1992; Wenner y Beatty, 1993). En cada etapa los organismos experimentan tanto cambios morfológicos como fisiológicos, por lo que las necesidades nutricionales cambian con su desarrollo (Tacon, 1990). La naturaleza de las dietas utilizadas en camarones son importantes ya que representan un factor muy esencial en la maduración, apareamiento, calidad espermática, fertilidad, fecundidad, en la viabilidad y en la calidad de la descendencia de los organismos en condiciones controladas y representan uno de los parámetros más importantes sobre los cambios bioquímicos de los órganos y tejidos involucrados en la maduración (Harrison, 1990; Browdy, 1992; Alfaro, 1990; Rosas *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2001; Castille y Lawrence, 1989). En cautiverio, las dietas están formuladas para cubrir los requerimientos de proteínas, lípidos y carbohidratos en distintas proporciones según su estadio. Las proteínas, no sólo ocupan una posición central por ser la base para la formación de enzimas, hormonas, hemocianina, componentes de la respuesta inmunitaria, sino que además intervienen directamente en la osmoregulación, y construcción de tejidos (crecimiento), su reparación y mantenimiento. Asimismo, son fuente de energía en los procesos catabólicos y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Rosas *et al.*, 2002). Varios estudios (Cevallos-Vázquez *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2001, 2002) sugieren que las proteínas en la dieta, más que los lípidos y los carbohidratos, son responsables de la calidad del espermátforo y los espermias en *L. vannamei* y *L. setiferus*. En particular, las proteínas juegan un papel importante en la formación del spike de los espermatozoides.

1.5 Condición fisiológica e inmune

Es importante conocer el estado de salud de los camarones tanto en poblaciones silvestres como en cultivadas, para obtener parámetros que nos puedan ayudar a evaluar cambios del estado de los organismos ante su entorno. Esto se ha logrado a través de ciertas mediciones, como son la cantidad de hemocianina (Chen and Cheng, 1993; Chen and Lin, 1994; Cheng *et al.*, 1996; Gilles, 1977; Boone y Schoffeniels, 1979; Hagerman and Weber, 1981; Rosas *et al.*, 2001), conteo de hemocitos (Tsing *et al.*, 1989; Martin y Graves, 1985; Rodríguez *et al.*, 1995; Van de Braak *et al.*, 1996), análisis de la presión osmótica (Péqueux, 1995) y capacidad osmótica (Charmantier *et al.*, 1989, Lignot *et al.*, 1999), evaluación de metabolitos en sangre (Tabla 4) (Rosas *et al.* 2001a, Rosas *et al.* 2001b, Racotta y Palacios 1998, Palacios, 1999). y algunas mediciones del sistema inmune, tal como es el proceso de la fenoloxidasa (Fo) y fenoloxidasa total (proFo + FO) (Hall *et al.* 1999; Montañó Pérez *et al.* 1999; Perazzolo and Barracco 1997; Sritunyalucksana and

Söderhäll 2000), hemaglutinación (Le Moullac *et al.*, 1998; López *et al.*, 2003), estallido respiratorio (Song y Hsieh, 1994), relación fenoloxidasa total células granulares y pacifastina (Le Moullac *et al.*, 1998; López *et al.*, 2003).

1.6 Calidad espermática

La reproducción en camarones está influenciada por factores ambientales (Bray y Lawrence, 1992; Ogle, 1992). En condiciones naturales, estos factores determinan la existencia de épocas de reproducción definidas, y cada uno de estos factores, puede estimular o inhibir el proceso reproductivo de una especie en particular (Browdy, 1992). Es por eso que en condiciones de cautiverio, es necesario reducir el estrés en el sistema, como el ruido, las altas densidades, el movimiento innecesario alrededor de los tanques de maduración, el manejo excesivo de los reproductores y además hay que mantener regímenes de limpieza estrictos (Wyban y Sweeney, 1991). Por otro lado, la temperatura y la iluminación, así como su interrelación, tienen un efecto significativo sobre la maduración de los camarones (Chamberlain y Lawrence, 1981; Chamberlain y Gervais, 1984; Primavera, 1985).

El potencial reproductivo de machos puede ser evaluado mediante el análisis de la calidad espermática, el peso del espermatóforo, el conteo de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides vivos y anormales. Adicionalmente, el tiempo de regeneración del espermatóforo (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987) y el peso del espermatóforo son factores que se han evaluado para determinar el potencial reproductivo de los machos.

2.- Hipótesis.

Si las proteínas del alimento modulan la condición nutricional e inmune de los camarones y ambas respuestas están estrechamente vinculadas con la calidad reproductiva, entonces a medida que aumente dentro de un intervalo óptimo la proporción de proteínas del alimento, aumentará también la condición fisiológica de los organismos, incluyendo su capacidad reproductiva.

3.- Objetivo general.

Evaluar los efectos de los niveles de las proteínas del alimento en la condición nutricional, la condición inmunológica y la capacidad reproductiva de una población de adultos de *L. setiferus* mantenidos en condiciones de cultivo con especial énfasis en la población de machos adultos de esta especie.

4.- Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de los niveles de proteínas de la dieta sobre la condición nutricional medida a través de diferentes metabolitos sanguíneos, reservas energéticas acumuladas (glucógeno y lípidos totales) en la glándula digestiva y músculo, y sobre el índice hepatosomático.
2. Evaluar el efecto de los niveles de proteína en la condición inmunológica medida a partir de los componentes sanguíneos involucrados en los mecanismos de defensa
3. Establecer el efecto del nivel de proteínas de la dieta sobre la capacidad reproductiva de los machos adultos determinada a través de la evaluación de la calidad espermática de los organismos cultivados.

5.- Materiales y Métodos

5.1 Origen de los organismos.

Los camarones utilizados en el presente estudio se obtuvieron de la inseminación artificial de hembras silvestres *L. setiferus* provenientes de la Laguna de Términos, Campeche, México. Las larvas obtenidas nacieron en septiembre del 2003. Se mantuvieron en el laboratorio de ecología y biología marina experimental en Ciudad del Carmen hasta que fueron transferidas ya como juveniles a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación Facultad de Ciencias, Sisal, Yucatán (UMDI) en marzo del 2004.

5.2 Diseño experimental

5.2.1 Mantenimiento de los organismos y estanques al tiempo cero (T0)

Un grupo de 1080 camarones se distribuyó en 9 estanques de tamaño piloto comercial (5m de diámetro y 20m² de superficie; densidad de 120 organismos / estanque) con una proporción de sexos 1/1. Una vez instalados se les alimentó con una dieta comercial (35% proteína, marca purina) de acuerdo a la biomasa de cada estanque (720gr \pm 20gr biomasa por estanque) con porciones de comida repartidas en 2 tomas de 36gr \pm 0.8gr (8:00 am y 6:00 pm), esta ración fue cambiando de acuerdo a la biomasa. La temperatura del agua de los estanques se mantuvo en 29°C \pm 2°C y la salinidad de 35 unidades prácticas de salinidad (UPS). Los estanques se conservaron con aireación constante y un sistema de flujo semicerrado con agua de mar proveniente de un pozo de 22 m de profundidad. El agua fue previamente sedimentada y filtrada (filtro de arena) antes de llegar a los estanques para mantener la calidad del agua. Los juveniles de *L. setiferus* permanecieron en estas condiciones desde que llegaron a la UMDI hasta junio del mismo año. Al cabo de este tiempo los camarones se consideraron como adultos debido al contenido espermático de los machos, se realizó una primer evaluación a la que se llamó tiempo cero (T0) el 20 de junio del 2004 para evaluar la condición nutricional, inmunológica y reproductiva en que se encontraba la especie. Estos datos se tomaron como referencia inicial para las dietas experimentales.

5.2.2 Dietas experimentales, mantenimiento de los organismos y estanques al inicio del estudio

Se prepararon en el laboratorio 3 dietas isocalóricas experimentales con distinto porcentaje de inclusión de proteína cruda (35%, 45% y 55% PC). Se varió principalmente el nivel de proteína, y se hizo un ajuste en el porcentaje de carbohidratos (Tabla 2) para equilibrar la aportación de energía de cada una de las dietas, de tal forma que fuera igual para todas.

Se eligieron 3 estanques al azar para cada una de las dietas experimentales. Los camarones se alimentaron de acuerdo a la dieta experimental asignada, tomando en cuenta la biomasa del estanque. Mensualmente se hizo el cálculo para adaptar la cantidad de alimento a los cambios en la biomasa de cada

estanque. El mantenimiento de los estanques consistió en un recambio periódico de agua en promedio 3 veces por semana de aproximadamente 20% por estanque. Se registraron los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad y oxígeno disuelto) diariamente, mientras que el pH se midió cada semana (Tablas 10.1 a 10.3 en anexos)

5.2.3 Periodo de Evaluaciones (T0, T1, T2 y T3)

Durante el periodo experimental se hicieron cuatro muestreos en los estanques, a fin de evaluar diversas respuestas biológicas en los organismos experimentales. La primera evaluación T0 a la que se hizo referencia con anterioridad, se tomó como el punto de partida para todas las dietas. Para esta evaluación se analizaron 35 camarones, de los cuales 18 (9 machos y 9 hembras) de ellos se utilizaron para el análisis de resultados, puesto que en el presente estudio sólo se tomaron en cuenta los datos de los camarones que se encontraron en la fase de intermuda (C) debido a que es una fase de equilibrio en cuestión de movimiento de nutrientes, en comparación con la fase de premuda (D) y la postmuda (B) (Barclay, *et al.*, 1983; Chen y Cheng, 1993; Gaxiola, *et al.*, 2005).

La siguiente evaluación se llevó a cabo el 25 de Agosto del 2004, un mes después del inicio de la alimentación con las dietas experimentales. En ésta primera evaluación de las dietas experimentales (T1) se evaluaron 54 camarones, 6 organismos por estanque, es decir, 18 organismos por dieta experimental. El mismo procedimiento fue utilizado para la segunda evaluación (T2) el día 23 de septiembre y para la tercera (T3) el día 22 de octubre del mismo año (Tabla 10.1 de anexos)

5.2.4 Captura de los organismos para la evaluación

Los camarones no fueron alimentados 12 horas antes de cada evaluación para evitar la interferencia de los nutrientes de la dieta en los metabolitos de la sangre (Rosas *et al.*, 2001b). Para la captura de los organismos se bajó 80% el nivel del agua, y posteriormente se capturaron cuidadosamente con redes en distintos puntos del estanque, evitando al máximo posible una manipulación brusca, para no alterar de manera significativa el comportamiento de los componentes sanguíneos. Los organismos capturados se introdujeron en hieleras (5 l de capacidad), las cuales se llenaron hasta la mitad con agua del estanque, y se les bajó la temperatura hasta alcanzar un valor 5°C menor a la temperatura del agua del estanque para así aminorar el estrés al bajar su

metabolismo con la baja de temperatura. Para hacer esto se utilizaron botellas plásticas llenas de agua congelada. Los organismos fueron llevados cuidadosamente al laboratorio dónde se realizaron los análisis. Se les dejó reposar 10 minutos sin la tapa del recipiente para que los organismos se acondicionaran al cambio de intensidad de luz ambiental y al cambio de temperatura, esto con el fin de reducir el estrés a causa de estos factores.

5.2.5 Análisis en el laboratorio

Se evaluaron distintas respuestas en los organismos (Tabla 1) medidos en la hemolinfa (fisiológicas, inmunológicas y presión osmótica), el hepatopáncreas (índice hepatosomático, glucógeno y lípidos), las branquias (estallido respiratorio), músculo (lípidos) y el espermatóforo (calidad espermática). Los detalles de cada evaluación se describen en el punto 5.4.

Tabla 1.- Diseño experimental completamente aleatorizado de la evaluación de 3 dietas experimentales (35%, 45% y 55% PC) en adultos de *L. setiferus* muestreados mensualmente por un periodo de cuatro meses (T0, T1, T2 y T3).

Respuestas a evaluadas	Evaluación por respuesta
METROLÓGICAS	Estadio de muda, Talla, Peso, Presión Osmótica.
FISIOLÓGICAS	Proteínas, Hemocianina, Proporción (Hc) / Proteína, Índice Hepatosomático, Glucosa, Lactato, Glucógeno, Acilglicéridos, Colesterol, Lípidos. Capacidad Osmótica.
INMUNOLÓGICAS	Hemaglutinación, proFo, Fo, Estallido Respiratorio, Conteo de Hemocitos, Relación

REPRODUCTIVA

fenoloxidasa total Células Granulares.

Peso del espermátforo, Conteo y caracterización de células espermáticas (normales, anormales y muertas).

5.3 Preparación de la dieta

Las tres dietas experimentales fueron preparadas tomando como base la misma dieta comercial que se proporcionó a los camarones muestreados al tiempo 0 (T0) (Purina, 35% de proteína). Se utilizó caseína y calamar (*Loligo sp*) molido para modificar el nivel de proteína, y se varió la proporción de carbohidratos para conservar el mismo porcentaje energético en las dietas. La mezcla húmeda de los distintos liofilizados más el calamar (Tabla 1), se depositaron en una máquina para moler carne, y de ahí se obtuvieron cilindros en forma de spaghetti, los cuales se secaron a 60 °C por 8h. Posteriormente los cilindros fueron cortados manualmente hasta obtener aproximadamente al tamaño de un pellet de tamaño comercial. Los pellets cortados se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Las dietas que se prepararon para el presente estudio fueron isocalóricas.

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales (% total de ingredientes)

Ingredientes	Nivel proteico, % PP *		
	35%	45%	55%
Alimento Comercial Purina ^a	55	55	55
Calamar (peso seco) ^b	10	10	10
Caseína ^c	10	21	32.6
Almidón de trigo ^d	22.6	11.6	0
Paprika	1	1	1
Rovimix C (35°C) ^e	0.42	0.42	0.42
Alginato Na ^f	1	1	1
Crudo de proteínas (%)	35.4	45.4	55.7
Crudo de lípidos	5.9	5.9	5.9
Carbohidratos (CBH, %)	34.7	24.735	
12.135			

Energía total (kJ.g ⁻¹) ^g	16.0	16.3	16,3
--	------	------	------

* PP: porcentaje protéico

^a Purina con 35% de proteína cruda (PC)

^b 50g de calamar húmedo es necesario para obtener 10g de calamar seco

^c Sigma, Mexico

^d Gluten y almidones industriales S.A. de C.V., Mexico

^e Fosfato ascórbico (Stay-C 35%, Roche)

^f Sigma, Mexico

^g Estimado por Cuzon y Guillaume (1987) con los coeficientes: 21.3, 17.6 y 39.5 kJ.g⁻¹ para proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente.

5.4 Evaluaciones en el laboratorio

5.4.1 Condición general

Para obtener las medidas metrológicas de los camarones se utilizó una balanza analítica para medir el peso, y una regla para medir la longitud del camarón. Las medidas de talla se tomaron desde la punta del rostrum hasta el final del telson. Se determinó el estadio de muda de los camarones mediante el estado de setogénesis observada en los urópodos (Chan *et al.*, 1988), y se clasificó como: postmuda (B), intermuda (C) y premuda (D).

5.4.1.1 Extracción y separación de hemolinfa



Una vez aclimatados los organismos a las condiciones de laboratorio, se tomaron las muestras de sangre. El organismo se secó cuidadosamente, para evitar la mezcla de hemolinfa con agua. Las muestras de hemolinfa se obtuvieron mediante su extracción con una jeringa hipodérmica de 3 ml con aguja de 21G x 32mm en la región ventral a la altura del último par de pereopodos y principio de los pleópodos. Las jeringas fueron endulzadas con una solución fría (8°C) de SIC-EDTA antes de empezar el muestreo para evitar la coagulación. La aguja se insertó suavemente a través de la membrana artroidal de la quinta pata, para tener acceso al seno. Lentamente se deslizó la aguja, y al mismo tiempo se extrajo lentamente el émbolo, para evitar la

formación de burbujas en la hemolinfa. La hemolinfa se colocó en papel parafilm, depositado sobre un recipiente con hielo para mantener fría la muestra e impedir el proceso de coagulación. Se extrajo rápidamente del parafilm para evitar que se coagulara. Se obtuvieron muestras de hemolinfa de aproximadamente 120µl por camarón, para poder evaluar los distintos indicadores sanguíneos (presión osmótica, hemocianina, hemocitos, metabolitos, fenoloxidasa, hemaglutinación y pacifastina).

5.4.1.2 Determinación de la presión osmótica.

La presión osmótica del organismo se obtuvo a partir de 20 µl de hemolinfa, ésta fue analizada en un micro-osmómetro (Osmete, 20 plus). También se obtuvo la presión osmótica del agua de cada estanque muestreado para obtener a partir de la diferencia entre la presión osmótica del organismo y del agua, la capacidad osmótica (CO).

5.4.2 Parámetros fisiológicos

5.4.2.1 Parámetros sanguíneos.

5.4.2.1.1 Obtención de la hemocianina

Se utilizó un espectrofotómetro con lámpara de UV considerando una longitud de onda de 335 nm. De la hemolinfa total se extrajeron 10 µl y se diluyeron inmediatamente en 990µl de agua destilada en la cubeta del espectrofotómetro.

Los valores obtenidos por la absorbancia fueron convertidos a unidades mg/ml. La concentración de hemocianina (mmol/l) se calculó usando el coeficiente de extinción 17.26 calculada con base en 74000 Da subunidades funcionales (Chen y Cheng, 1993). El valor de la absorbancia se dividió entre el coeficiente de extinción y se multiplicó por el factor de dilución (FD), que en este caso fue de 100 (10µl de hemolinfa/ 990µl de agua destilada). Para el análisis de la proporción hemocianina/proteína (Hc/P) se tomaron en cuenta los valores en mmol/l. Los valores de proteína expresados en mg/ml fueron convertidos a mmol/L al dividir entre 66, que equivale al peso molecular por mg de 1 mol de albúmina bovina.

5.4.2.1.2 Bioquímica sanguínea

De la hemolinfa total obtenida por organismo, se designaron aproximadamente 55 μ l para la medición de metabolitos. La hemolinfa se diluyó 2 veces en SIC-EDTA frío. Los tubos con SIC-EDTA fueron previamente preparados en tubos Eppendorf (1.5 ml) y marcados de forma numérica progresiva con plumón indeleble, de acuerdo al número de organismos muestreados. Las muestras de hemolinfa, se mezclaron varias veces con la micropipeta en los tubos Eppendorf con el anticoagulante. Una vez diluidos, los tubos Eppendorf se centrifugaron a 2500 revoluciones por minuto (rpm) por 3 min a 4°C. Ya centrifugado se recuperó el sobrenadante (plasma + SIC-EDTA) el cual fue colocado en otros tubos numerados de la misma manera. Estos nuevos tubos se mantuvieron de igual forma en frío (2-8°C)

Se utilizaron juegos de reactivos comerciales para la cuantificación de glucosa (Bayer-Sera-Pak Plus B01 45 09-01), lactato (Sigma 735-10 + H₂O libre de pirógenos), colesterol (Bayer-Sera-Pak Plus B01 4507-01), y acilglicéridos (Bayer-Sera-Pak Plus B01 4551-01), a través de las cuales se evaluaron colorimétricamente reacciones enzimáticas. Las proteínas solubles totales (proteínas BIO-RAD-500-0006 + H₂O libre de pirógenos en proporción 1:4) se cuantificaron mediante las reacciones de enlaces químicos de una solución ácida de color (Bradford) por la presencia de proteínas. Para el caso de lactato se utilizó el reactivo Sigma 735-10, al que se añadió 10ml de agua libre de pirógenos.

Una vez obtenido el plasma se mantuvo a una temperatura de 2-8°C y se procedió a evaluar cada uno de los metabolitos. Para cada metabolito se designó una microplaca para lector de ELISA. Todas las placas contenían 3 repeticiones de blanco (10 μ l agua libre de pirógenos + 200 μ l de reactivo) el cual sirvió para eliminar la absorbancia que presentan las sustancias ajenas a la reacción con la que se evalúa cada metabolito. Para cada metabolito se determinó una curva de calibración la cual fue el resultado de tres mediciones independientes (Tabla 4). Esta curva se utilizó para cuantificar la concentración total del metabolito y fue preparada a partir de una solución estándar incluida en los reactivos comerciales.

Se utilizaron 10 μ l de muestra del plasma para la cuantificación de cada metabolito (Tabla 3). A cada pozo de la microplaca se le adicionaron 200 μ l de solución reactiva comercial.

5.4.2.2 Bioquímica del hepatopáncreas y músculo

A cada organismo se le tomó el peso del hepatopáncreas (Hp) completo y posteriormente se le hicieron 2 cortes, uno fue destinado para medir lípidos, y el otro para medir glucógeno. El peso del corte del Hp para la medición de glucógeno fue de entre 0.02g a 0.06g, cantidad que es suficiente para determinar el glucógeno utilizando pequeñas muestras. A las muestras de tejido se le adicionaron 200 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Una vez que se obtuvieron los cortes del Hp y músculo, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se mantuvieron a -40°C hasta su utilización para las mediciones respectivas.

El glucógeno de la glándula digestiva se midió a partir del corte del Hp obtenido en el muestreo. Se homogenizó el tejido, y el contenido fue centrifugado a 7000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue desechado. Al pellet se le adicionaron 200µl de fenol (5%) y 1ml de ácido sulfúrico. En una microplaca de lector de ELISA se distribuyeron 200µl de las muestras en cada pozo. Cada muestra se hizo por triplicado, al igual que una muestra de blanco (200µl de fenol 5%; 1ml de ácido sulfúrico) y una de estándar (10µl del estándar comercial de glucosa, 200µl de fenol al 5% y 1ml de ácido sulfúrico). El cálculo se realizó de la misma manera que se hace para el caso de los metabolitos.

Los lípidos en glándula digestiva y en músculo, fueron evaluados de acuerdo a Folch *et al.* (1957). El tejido fue homogenizado con cloroformo-metanol (2:1). Posteriormente el homogenizado se vació en un matraz de 50ml, y se agregó cloroformo-metanol (2:1) hasta alcanzar un volumen final de 20 ml. El matríz fue cubierto con parafilm y puesto en el agitador por 15 min. La muestra fue filtrada en vacío y se pasó al embudo de separación donde se aforó con agua-metanol (3:1), se agitó y dejó reposar hasta observar la separación de los lípidos (diferencia de color). Estos se depositaron en frascos previamente pesados. Los frascos fueron colocados en un desecador hasta que se evaporó toda la muestra. La cantidad de lípidos se obtuvo a partir de la diferencia entre el peso inicial y el final del frasco. Ese valor se consideró como el total de lípidos por miligramo de tejido.

5.4.2.3 Índice hepatosomático

Con el peso del hepatopáncreas (g) se obtuvo el índice hepatosomático (IHp), dividiendo el peso total del Hp, entre el peso total del organismo (g).

5.4.3 Condición inmunológica

5.4.3.1 Parámetros sanguíneos

5.4.3.1.1 Determinación de la actividad de la fenoloxidasasa (FO) y la fenoloxidasasa total

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

La actividad de fenoloxidasa (FO) fue determinada midiendo espectroscópicamente la oxidación de la L-hydroxifenil alanina (L-DOPA), de acuerdo a Leonard *et al.* (1996). Una modificación reportada por Hernández-López *et al.* (1996) al método de Leonard fue introducida en el procedimiento. Esta modificación consiste en la utilización de microplacas para la determinación en muestras de pequeño volumen. Para la evaluación de fenoloxidasa total fue necesario asegurar la conversión de la profenoloxidasa (proFO) a su forma activa, fenoloxidasa, para lo cual, se incubaron 50 µl de tripsina tipo IX de páncreas de bovino (0.1 mg/ml) durante 3 min a 25 ± 2 °C. Posteriormente, 50 µl de L-DOPA (3 mg/ml en amortiguador de cacodilatos) fueron suministrados a la reacción y se incubó durante 10 min (Hernández-López *et al.*, 1996). Se registró la absorbancia de la reacción a 490 nm en un lector de microplacas (BIO-RAD Modelo 550). Para determinar la actividad de FO en plasma fue omitida la incubación primaria con tripsina y se prosiguió de igual manera a la descrita anteriormente.

5.4.3.1.2 Hemaglutinación

A partir de sangre humana O+ se llevó a cabo la técnica de hemaglutinación. La sangre se obtuvo del banco de sangre del hospital O´HRAN de Mérida Yucatán. La sangre se suspendió en una solución salina isotónica (SSI) al 2% (v/v). El plasma del camarón se tomó a partir de cada organismo muestreado mensualmente. La hemolinfa se diluyó 1:3 con SIC-EDTA. En una microplaca de Falcon, con los pozos en forma de "U", se depositó en la primer columna 50µl de SSI y se adicionaron 50 µl de eritrocitos al 2%. Esta columna fue nuestro control. A partir de la segunda columna, en todos los pozos que se utilizaron, se adicionó 50 µl de SSI. En la segunda columna, además se adicionó la muestra de plasma de cada organismo muestreado, y se procedió a hacer diluciones hasta la columna doce. Al terminar se adicionó con una micropipeta multicanal 50 µl de eritrocitos al 2% a cada pozo. Se dejó reposar durante 2hrs a temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Los resultados fueron expresados como actividad de hemaglutinación (HU/mg de proteína).

5.4.3.1.3 Conteo de hemocitos

Se mezclaron 150 µl de hemolinfa con un volumen igual de solución Alsever (113 mM glucosa, 27.2 mM citrato de sodio, 2.8 mM ácido cítrico, 71.9 mM NaCl) y formol al 10 % (v/v) (Le Moullac *et al.*, 1997). La muestra se guardó en refrigeración hasta su análisis, para lo cual se utilizó un microscopio óptico (Micromaster, Fisher Scientific). Para el conteo de hemocitos, se empleó el hematocitómetro de la cámara de Malassez con volumen de 0.01 mm^3 . El conteo total de hemocitos se realizó manualmente. La caracterización de los hemocitos se realizó con base en el tamaño, la forma y el contenido granular, y se clasificaron como células granulares (CG), semigranulares (CSG) y hialinas (CH).

5.4.3.1.4 Determinación del estallido respiratorio

La producción intracelular del anión superóxido de los hemocitos fue cuantificado usando la reducción de NBT (Nitroblue Tetrazolium) a formazán de acuerdo a Song y Hsieh (1994). Se depositaron en los pozos de microplaca 100 μ l de hemolinfa en anticoagulante en proporción 1:1 (v:v) previamente cubiertos con 100 μ l de solución de poli-L-lisina (2 %) para mejorar la adhesión celular. Las microplacas fueron centrifugadas a 300 g por 15 min. El plasma fue removido y 100 μ L de Zymosan fueron añadidos (0.1% en solución de Hank menos fenol rojo), y la reacción incubada por 30 min a temperatura ambiente. El zymosan fue descartado y los hemocitos lavados tres veces con 100 μ l de solución Hank, para posteriormente teñirlos con 100 μ l de solución NBT (0.3 %) por 30 min a temperatura ambiente. La solución de tinción fue removida y los hemocitos lavados y fijados tres veces con 100 μ l de metanol (70 %) y secados. Para disolver el formazan se añadieron 120 μ l de KOH y 140 μ l de DMSO (Dimetil Sulfoxido). Se registró la densidad óptica por duplicado a 630 nm, utilizando un lector de microplaca (Bio-Rad Mod. 550).

5.4.4 Calidad espermática

Para la evaluación de la calidad espermática y la cantidad de espermatozoides se realizaron observaciones del contenido del espermatóforo de los machos. El espermatóforo se colocó en solución salina libre de calcio (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987) la cual permitió que los espermatozoides se mantuvieran vivos durante un periodo de hasta 4 horas. Para realizar el conteo del espermatóforo completo, este se homogenizó en 2 ml de solución libre de calcio en un homogenizador. Posteriormente se le añadió 0.1 ml de azul de Tripán al 1.0% (Leung-Trujillo y Lawrence, 1987). Esta suspensión de espermatozoides se dejó reposar por un lapso de 10 minutos para que el azul de Tripán actuara sobre las células. Así los espermatozoides muertos se identificaron como aquellas células que se tiñeron en dicho tiempo, así como espermatozoides de un volumen mayor que lo normal, lo cual señala la entrada de agua en la célula. Las células anormales fueron reconocidas por la presencia de malformaciones de la cabeza o ausencia del "spike".

El conteo de espermatozoides se realizó en un hematocitómetro (cámara Neubauer Loptic Labor) en la cuadrilla central (1 x 1 mm. y con capacidad de 0.1 mm.³) debido a que son células menores a 8 micras. La cámara utilizada estaba dividida en 16 cuadros de (0.25x0.25mm) de los cuales se contaron los cuatro cuadros de la esquina y uno más al azar (de 0.25 x 0.25 mm.). El conteo se hizo por duplicado tomando en cuenta las dos cuadrillas de cada cámara.

El número de células por espermatóforo se calculó de la siguiente manera: Cel/ml = (P*16)*FD* 10 000, donde: P = Números células promedio encontradas en los 10 cuadrantes contados; 16 = Cuadrantes de la cámara; Factor de Dilución = 2.1. En este caso el resultado obtenido (cel/ml) es igual a células por espermatóforo ya que se está multiplicando por el factor de dilución.

Este cálculo se hizo por separado para las células normales, anormales, muertas y totales y el resultado se expresó como células x 10⁴ /espermátóforo (Pascual *et al.*, 1998).

5.4.5 Análisis estadísticos

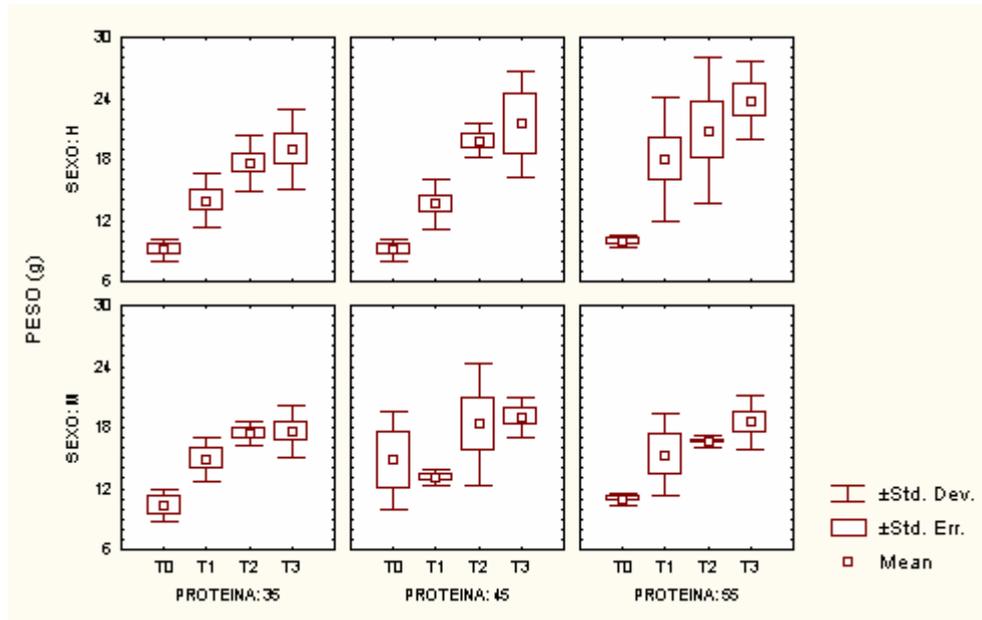
Se utilizó para el análisis de los resultados una prueba de ANOVA multivariado. El análisis se realizó en el programa Statistica. Como variables independientes se utilizaron el sexo, la dieta (porcentaje de proteína) y el periodo de evaluación (T0, T1, T2 y T3). Para todos los análisis se utilizó como cofactor el peso. Los valores de “p” significativos de cada resultado, se encuentran descritos en la tabla 10.2 de anexos.

6.- Resultados

6.1 Indicadores metrológicos

Durante los 4 meses que duró el ensayo las hembras y los machos presentaron crecimientos diferenciados (Fig 1). La relación entre el cambio de peso y talla con respecto al tiempo indican que las hembras presentaron tasas de crecimiento mayores que los machos, con un aumento en peso promedio de 9.2g a 22g y de 2.5cm de talla en tres meses, y de 12g a 18.8g con un crecimiento de 1.3cm para el caso de los machos. Se utilizó a la pendiente de la relación entre cambio de peso y tiempo como un indicador de la tasa de crecimiento de los animales experimentales. Así mismo se observó que las hembras de camarón alimentadas con 55% de proteína presentaron una tasa de crecimiento mayor que la observada en los animales alimentados con los otros dos niveles de proteína ($P < 0.05$; Fig 1), ganando en tres meses 14.4g de peso promedio y 3.5cm de longitud, mientras que en las hembras con los otros tratamientos aumentaron 10g con 2.42cm , y en los machos 6.8g con 1.3cm. Por el contrario, los machos mostraron una mayor tasa de crecimiento cuando fueron alimentados con 45% de proteína ($P < 0.05$; Fig 1), con una ganancia en peso de 7g, estando 0.5g por arriba de los valores obtenidos en machos alimentados con 55% de proteína, y 1.2g de los machos alimentados con 35%.

A)



B)

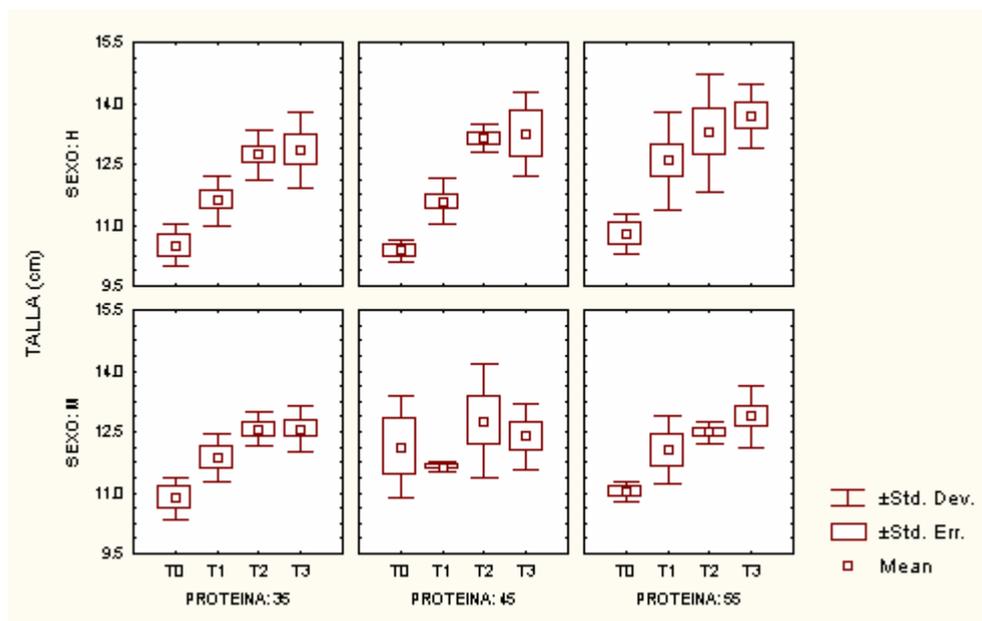


Fig. 1. Variaciones de peso en gramos (A) y talla en centímetros (B) de adultos, hembras y machos de *L. setiferus* alimentados con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%) muestreados mensualmente durante tres meses, tomando en cuenta la primer evaluación como punto de referencia (T0) y tres evaluaciones mensuales posteriores (T1, T2 Y T3). Valor promedio \pm E.S.

6.1.1 Presión osmótica

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que la presión osmótica varió entre 868 a 1013 sin mostrar diferencias significativas entre las dietas o el muestreo. No se observaron diferencias significativas entre sexos ($P < 0.05$; Fig. 2)

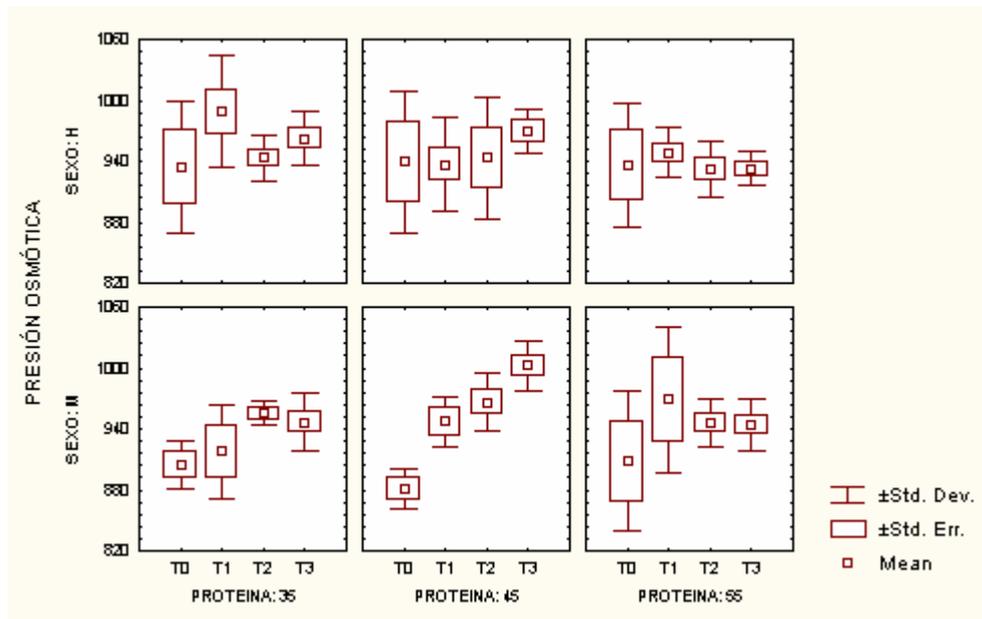


Fig. 2 Variación de la presión osmótica de camarones *L.setiferus* mantenidos en estanques piloto comercial, alimentados con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%) en un periodo de tres meses, a partir del punto una primer evaluación de referencia T0. Valor promedio \pm E.S

6.2.- Indicadores Fisiológicos

6.2.1 Capacidad Osmótica (CO)

Aunque la CO no mostró diferencias entre sexos se observó que ésta cambió en relación con el tiempo ($p < 0.05$), oscilando sus valores entre 11 y – 286

mOsm/kg, con los valores mayores en los animales al T0, que van de 11 a -127 y los menores en aquellos que fueron muestreados al final del experimento de -106 a -260 . Es interesante hacer notar una interacción entre las proteínas del alimento y el tiempo ($p < 0.05$). Esta interacción se debió a que en los animales alimentados con 35%, y 45% de proteína cruda (PC) la CO resultó mayor que la observada en los animales alimentados con 55% PC quienes presentaron una reducción de la CO directamente con el período de cultivo. Así mismo se observó que la CO obtenida de los animales alimentados con 45% PC mostraron en general, una mayor capacidad osmótica en comparación con los animales alimentados con las demás dietas ($p < 0.05$; Fig. 3).

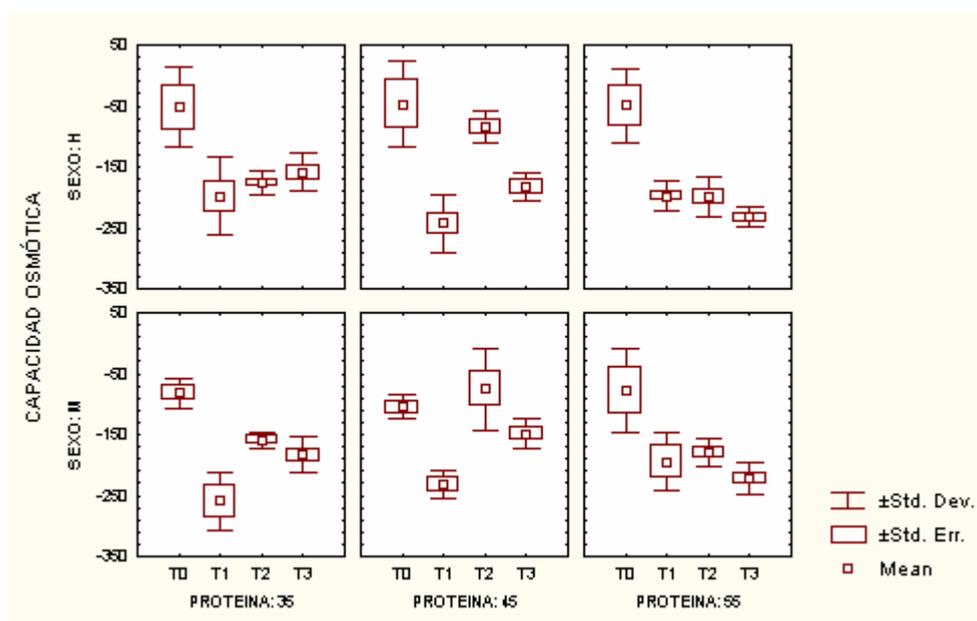


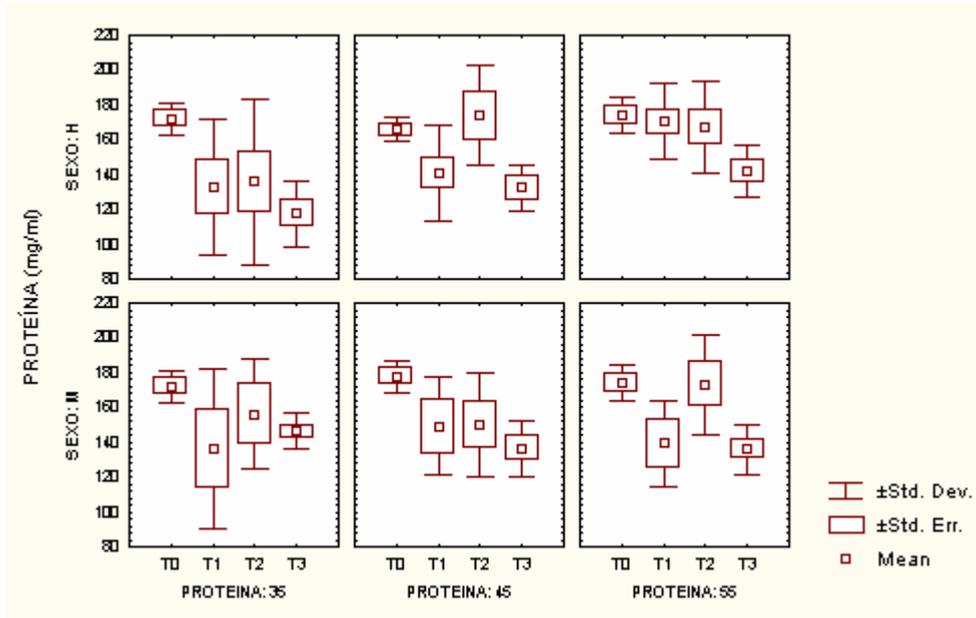
Fig. 3 Capacidad osmótica en camarones adultos *L. setiferus* mantenidos en estanques tamaño piloto comercial por un periodo de 3 meses (con una evaluación de referencia T0), alimentados con distintos porcentajes de proteína en dieta (35, 45 y 55%). Valor promedio \pm E.S

6.2.2 Proteínas, Hemocianina y relación Hemocianina/proteínas.

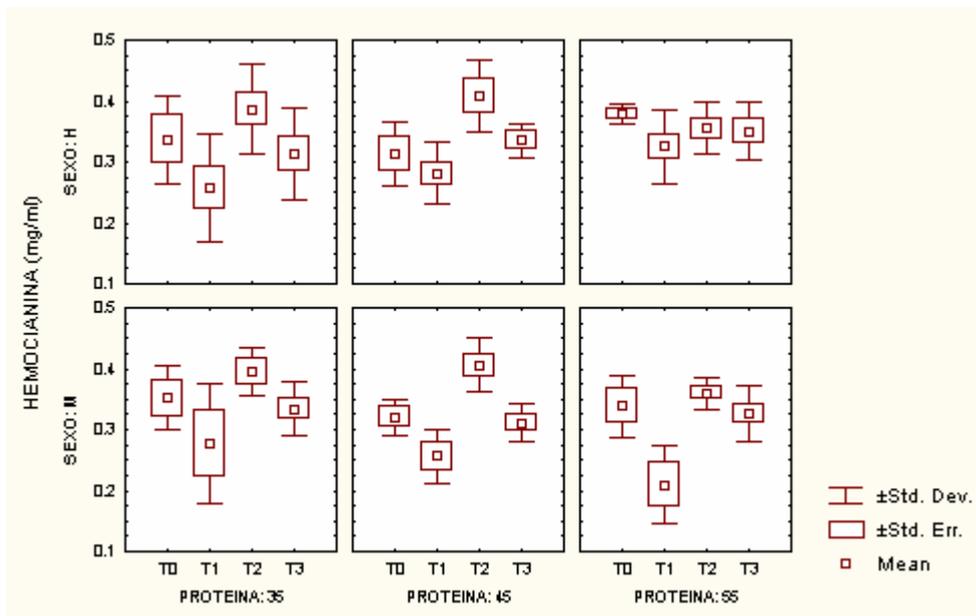
Las proteínas de la hemolinfa mostraron un comportamiento irregular a lo largo del período de cultivo, con valores que oscilaron entre 110 y 188 mg/ml. Los valores mayores se encontraron en T0 y los menores al tercer muestreo. Un efecto significativo del tiempo de cultivo fue observado en los camarones alimentados con los tres tratamientos mostrando que los niveles de proteína no fueron afectados ni por el sexo ni por el nivel de proteínas del alimento ofrecido ($P < 0.05$; Fig. 4). De manera similar a las proteínas la hemocianina (Hc)

mostró variaciones a lo largo del periodo de cultivo, con niveles altos en T0 y bajos en el tercer muestreo (Fig. 4). Las oscilaciones de la Hc mostraron intervalos de variación entre 0.17 y 0.43 mmol/l en donde únicamente el efecto del día de muestreo resultó afectar significativamente la concentración de Hc en ambos sexos, independientemente del nivel de proteínas de la dieta ($P < 0.05$; Fig. 4). La relación Hc/proteína mostró una reducción en las proteínas de la sangre asociada con el periodo experimental con los valores más bajos en T0, en promedio 74.14 mmol/l y los más altos al final del periodo experimental 91.8 mmol/l en promedio ($P < 0.05$; Fig. 4).

A)



B)



C)

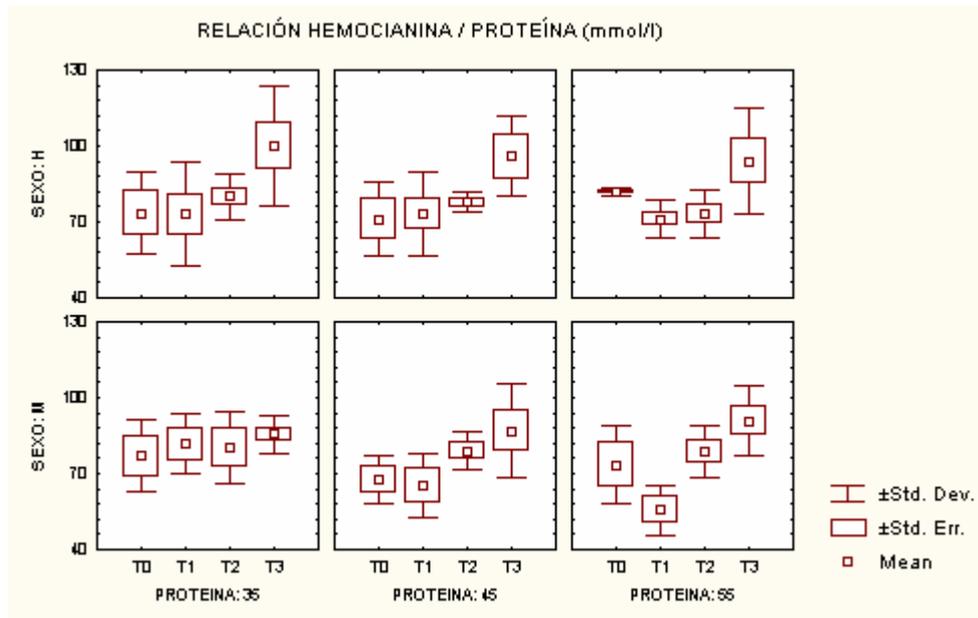


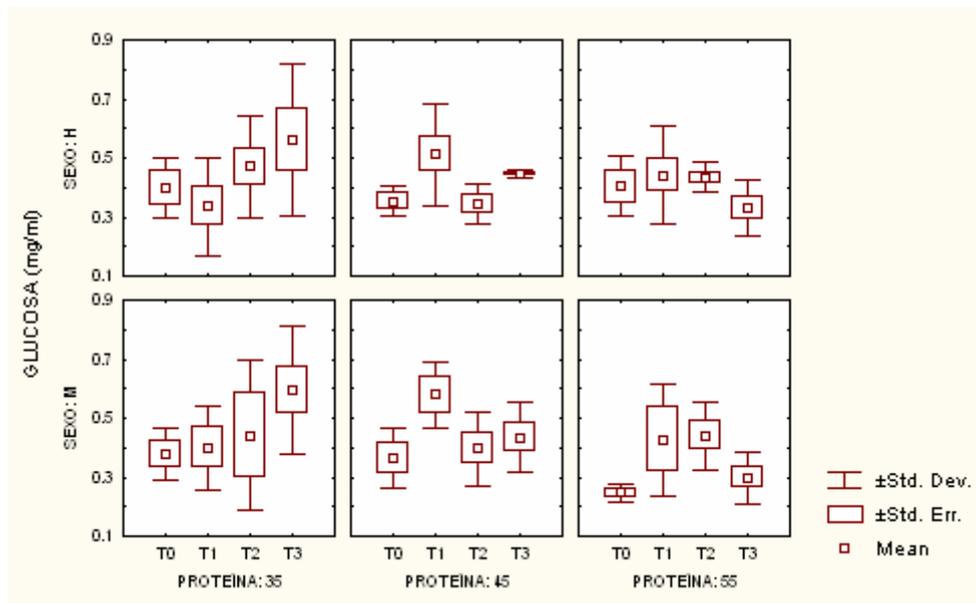
Fig.4 Variación de las proteínas (mg/ml) (A), hemocianina (mg/ml) (B) y relación Hc/proteínas (mmol/l) (C) en camarones adultos de *L.setiferus* mantenidos en estanques piloto comercial, alimentados con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%), tomando como referencia la primer evaluación (T0) para todas las dietas, y posteriormente se realizó una evaluación mensual (T1, T2 Y T3). Valor promedio \pm E.S

6.2.3 Glucosa, lactato y glucógeno

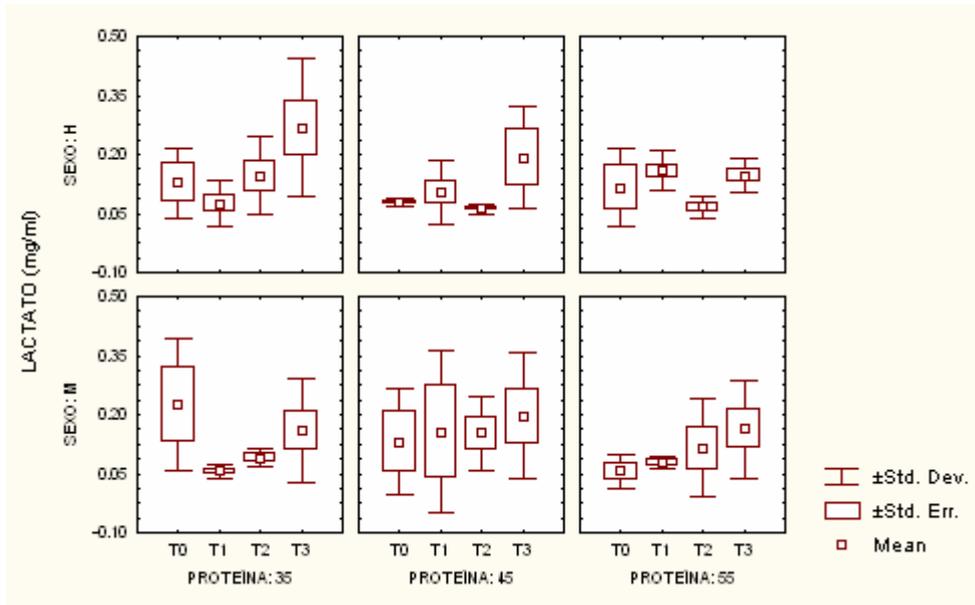
Una interacción significativa entre la fecha de muestreo y los niveles de proteína en la dieta afectaron los niveles de glucosa en la hemolinfa de los camarones de ambos sexos, con valores que oscilaron de 0.033 mg/ml hasta un valor máximo de 1.029 mg/ml. Es interesante hacer notar que, hacia el final del periodo de cultivo, los camarones alimentados con 35% PC mostraron niveles de glucosa significativamente mayores que aquellos alimentados con 45 y 55% PC, con un valor promedio de 0.579 mg/ml, estando 0.14 mg/ml por arriba de la dieta 45% y 0.266 mg/ml de la dieta 55%. Los niveles de lactato en sangre fueron únicamente afectados por el tiempo de cultivo con valores que oscilaron entre 0.03 y 0.33 mg/ml ($P < 0.05$; Fig. 5).

El nivel de proteínas de la dieta, el tiempo y el sexo mostraron una interacción significativa sobre los niveles de glucógeno de la glándula digestiva. Un nivel mayor de glucógeno fue observado en los animales alimentados con 55% de proteína (4.8 mg/ml, valor promedio) , con valores cercanos a estos los alimentados con 45% (3.7 mg/ml, valor promedio) y por debajo los de 35% (2.8 mg/ml, valor promedio) (Fig. 5; $P < 0.05$).

A)



B)



C)

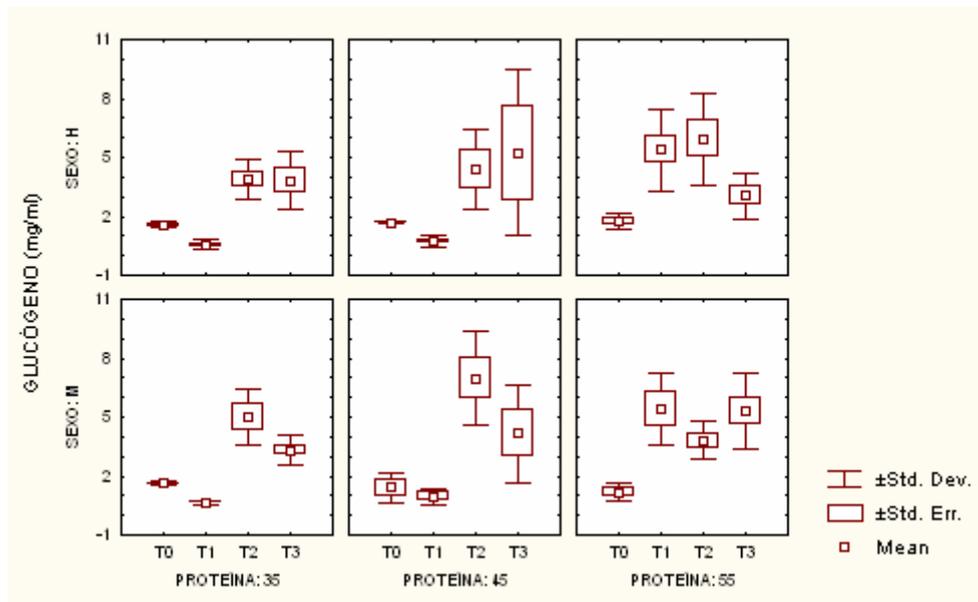


Fig.5 Variación en mg/ml de glucosa (A), lactato (B) y glucógeno en la glándula digestiva (C) de camarones *L.setiferus* mantenidos en estanques piloto

comercial, alimentados con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%) por un periodo de tres meses, tomando como referencia T0. Valor promedio \pm E.S.

6.2.4 Índice hepatosomático

El índice hepatosomático (IH) mostró diferencias con respecto al tiempo y al sexo de los camarones experimentales, con valores que oscilaron de 0.0212 a 0.0709. Los valores de IH más elevados se encontraron tanto en machos como en hembras alimentados con la dieta con 45% PC, durante la primera evaluación de la dieta en machos, y la tercer evaluación en hembras ($P < 0.05$, Fig. 6).

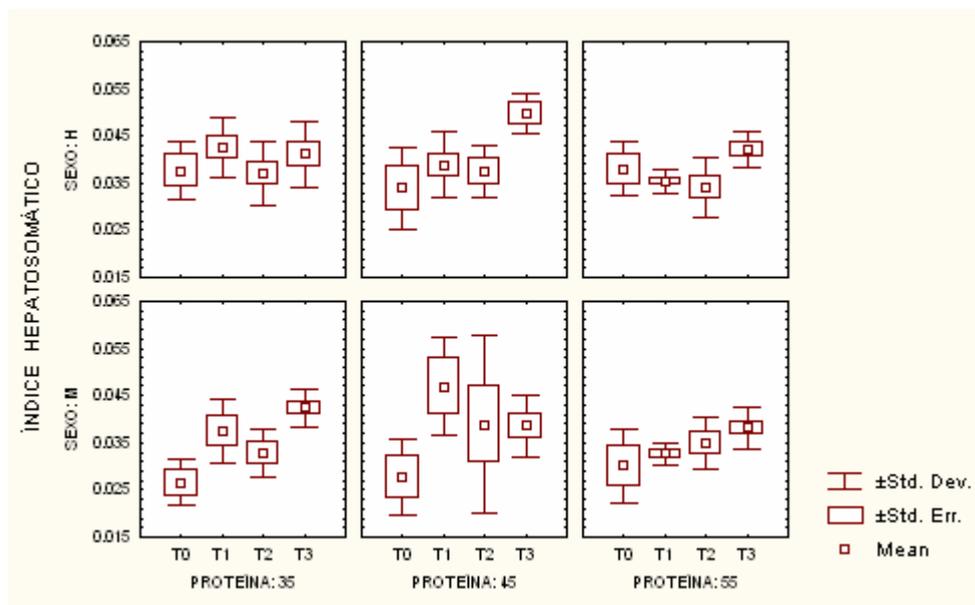


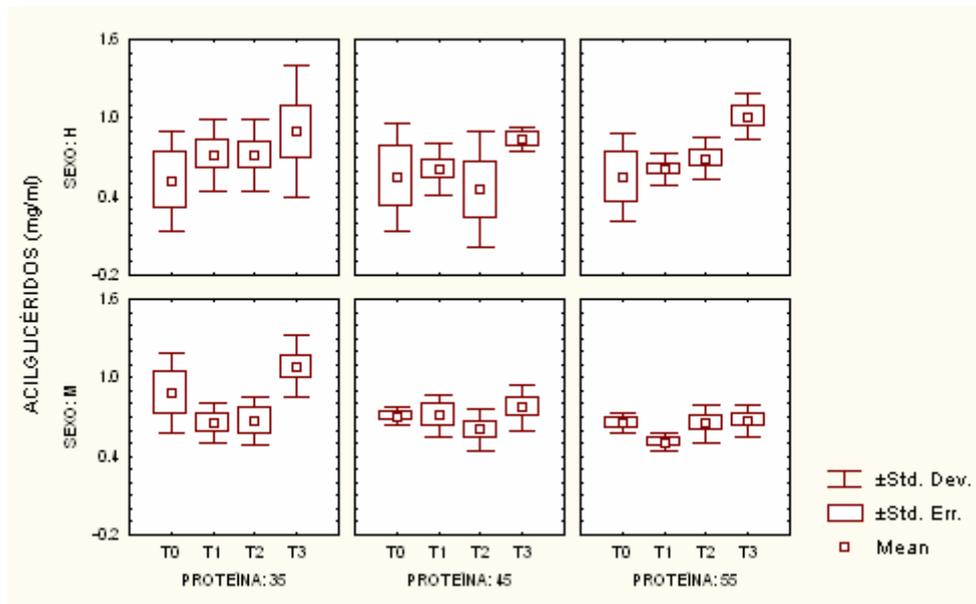
Fig. 6 Distribución de datos del índice hepatosomático en camarones machos y hembras adultos de *L. setiferus* alimentados con distintas dietas variando el porcentaje de proteína cruda (35%, 45% y 55%), mantenidos en estanques

piloto comercial por un periodo de 3 meses con una evaluación de referencia T0. Valor promedio \pm E.S.

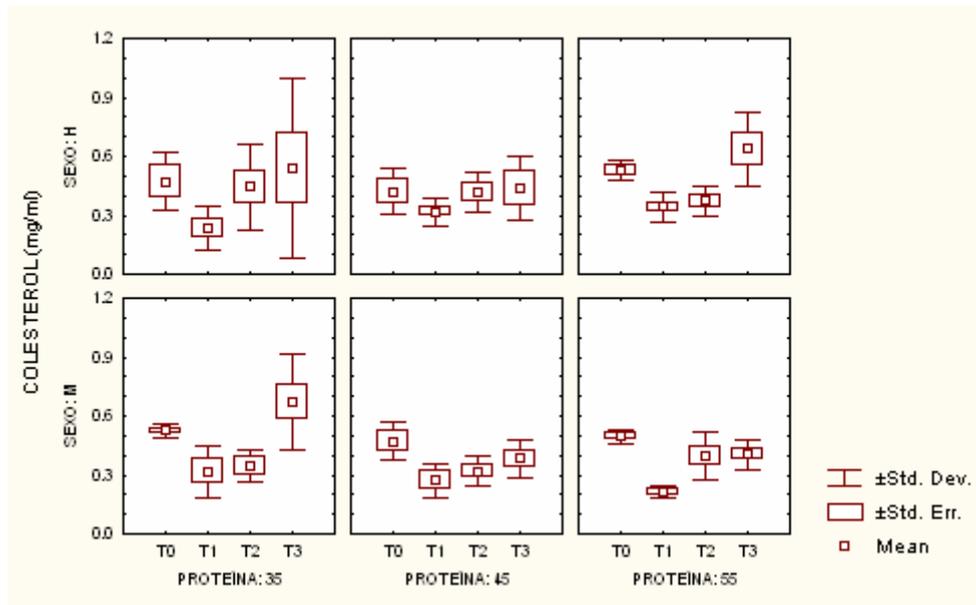
6.2.5 Acilglicéridos, colesterol y lípidos

Los niveles de acilglicéridos y colesterol fueron afectados por el tiempo de cultivo, en general valores mas altos hacia el tercer muestreo, independientemente del nivel de proteínas y del sexo ($P < 0.05$; Fig. 7), con datos que van de 0.0675 a 1.7518 mg/ml para el caso de los acilglicéridos, y para el caso del colesterol de 0.0446 a 1.3919 mg/ml. Por otro lado en el caso de lípidos, particularmente en hepatopáncreas, hubo diferencias significativa respecto al tiempo, con valores que oscilan de 0 a 868.3 mg/g de tejido (Fig. 7). En cambio, los niveles de lípidos en músculo no mostraron diferencias significativas respecto al tiempo, sexo o proteína. Los valores fueron de 0 a 119.6 mg/g de tejido (Fig. 7).

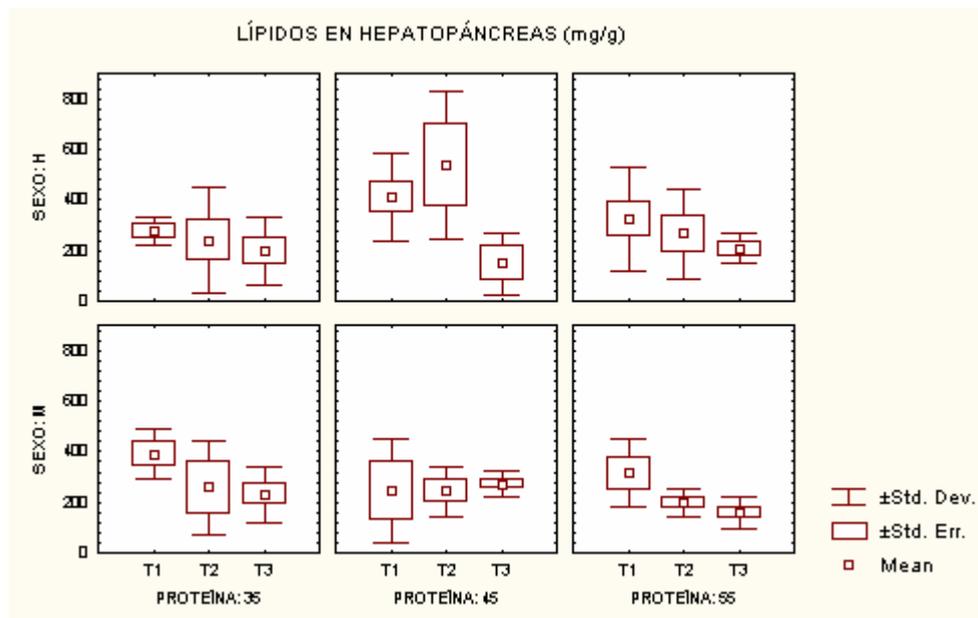
A)



B)



C)



D)

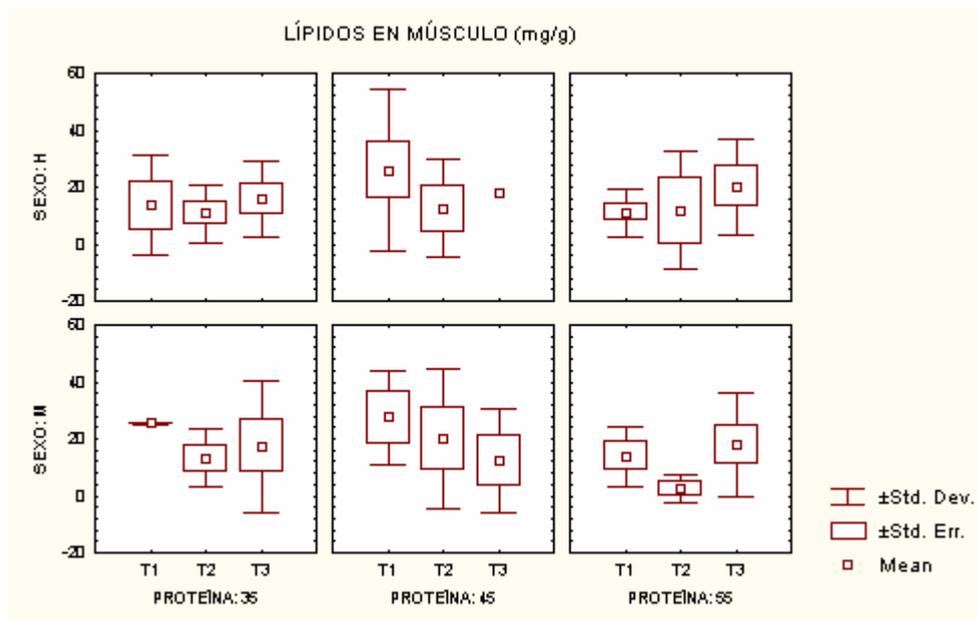


Fig. 7. Datos de acilglicéridos (A), Colesterol (B), lípidos de la glándula digestiva (C) y del músculo (D) de camarones *L.setiferus* mantenidos en estanques piloto comercial, alimentados por tres meses con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%), tomando como referencia la evaluación al T0. Valor promedio \pm E.S.

6.3.- Indicadores inmunológicos

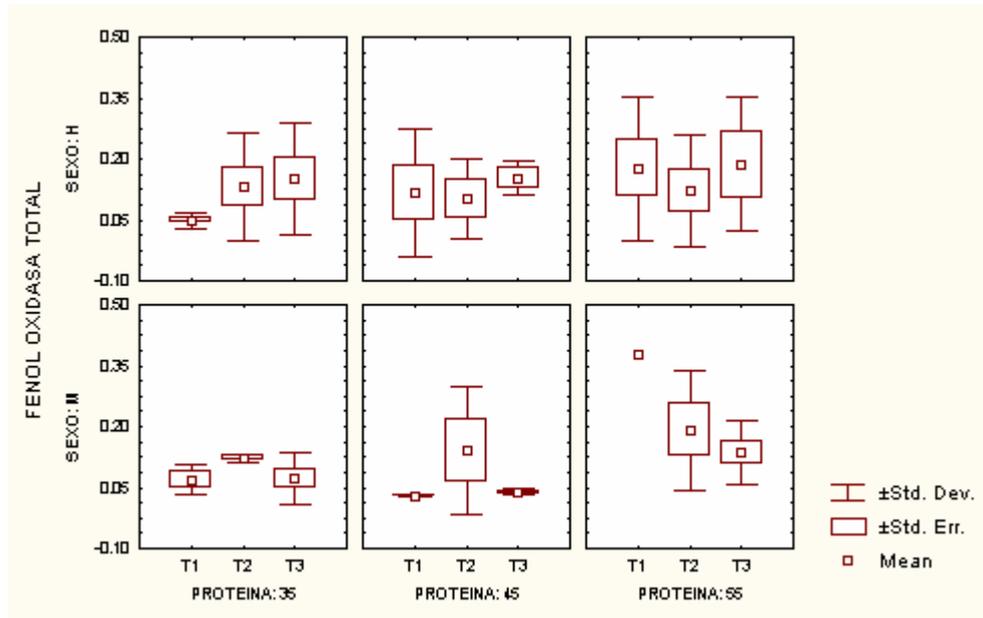
6.3.1 Sistema fenoloxidasa y hemaglutinación

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron en general, que la condición inmunológica de los camarones fue afectada tanto por el tiempo del cultivo como por el nivel de proteínas en las dieta y la interacción entre éstas. (Fig. 8).

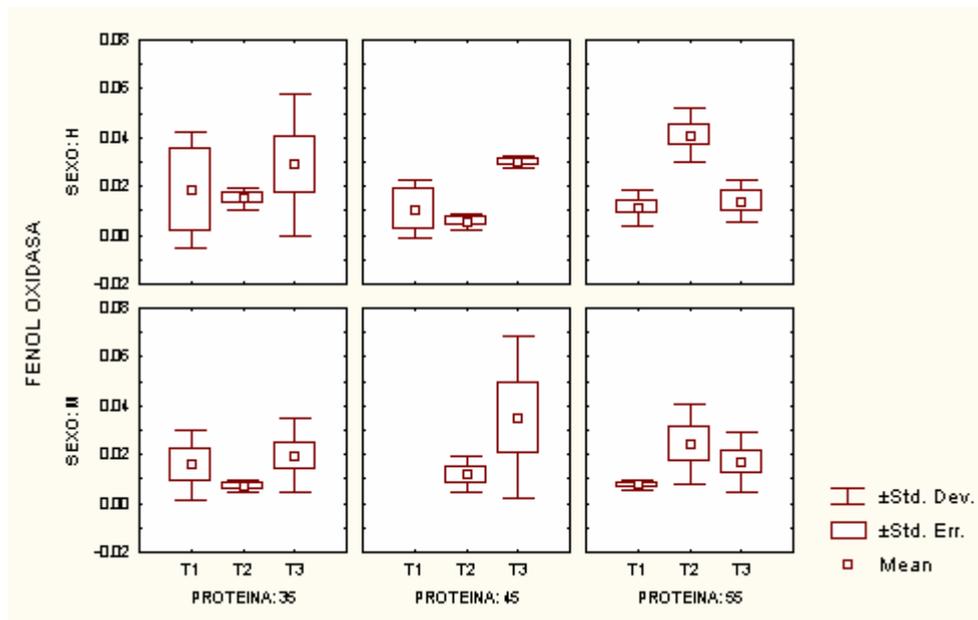
La fenoloxidasa total presentó una variación de los datos de 0.0077 a 0.48, sin diferencias significativas entre la dieta, el tiempo de muestreo o el sexo ($P < 0.05$; Fig. 8). La interacción entre el tiempo y el nivel de proteínas en el alimento, afectaron significativamente a la fenoloxidasa en plasma (FO), con valores que oscilaron entre 0.0010 y 0.094 (Fig. 8).

La hemaglutinación presentó un patrón asociado con el nivel de PC en la dieta experimental. Es importante hacer notar que los valores más altos se encontraron en los animales alimentados con la dieta con 35% PC ($P < 0.05$; Fig. 8), con valores que van de 1.5 unidades/mg a 38.1, en comparación con la dieta 45% (1.8 a 20.6 unidades/mg) y la de 55%(1.3 a 27.3 unidades/mg).

A)



B)



C)

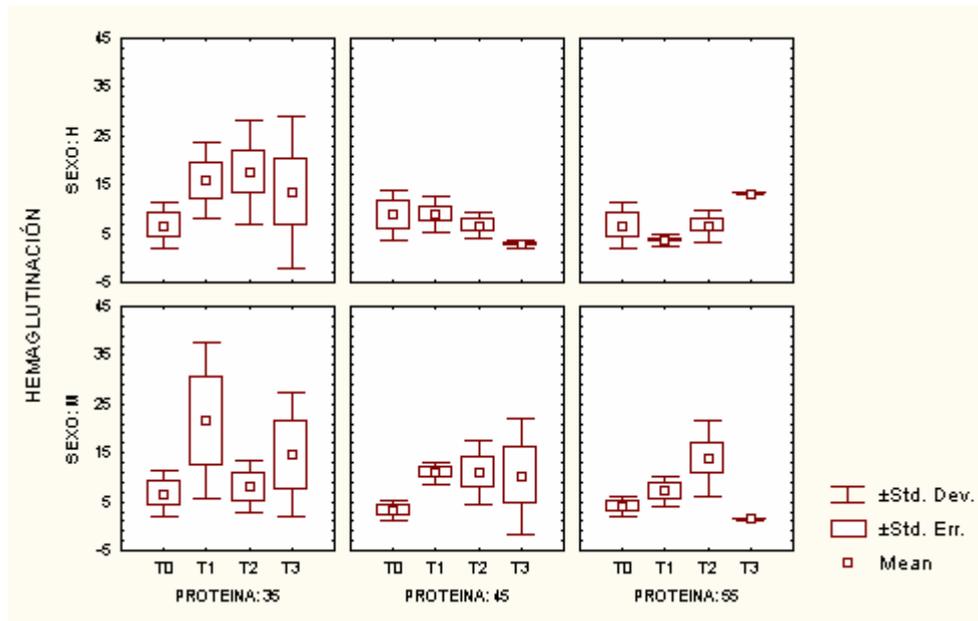


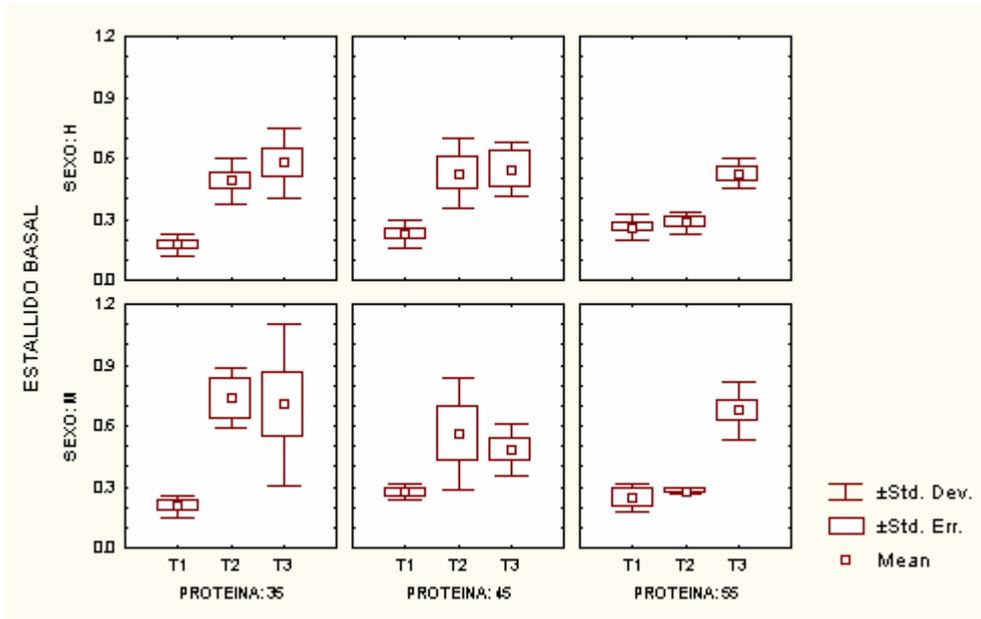
Fig.8 Variación mensual (3 meses) a partir de una evaluación de referencia (T0) de la fenol oxidasa en lisado de hemocitos (A) fenol oxidasa en plasma (FO) (B) y hemaglutinación (C) de camarones *L.setiferus* mantenidos en estanques piloto comercial, alimentados con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%). Valor promedio \pm E.S.

6.3.2 Estallido respiratorio basal y activado

En los organismos el estallido respiratorio basal mostró diferencias significativas con respecto al muestreo y una interacción entre el tiempo y el nivel de proteína del alimento ($P < 0.05$; Fig. 9). El estallido basal aumentó notablemente del primer muestreo al segundo en los animales alimentados con 35% (valores promedio de 0.18 a 0.605) y 45% PC (valores promedio de 0.245 a 0.54). En cambio, en los animales alimentados con 55% PC mostraron un comportamiento inverso con niveles estables en el primer y segundo muestreo y un aumento notable en el tercer muestreo (valores promedio de 0.28 a 0.595).

El estallido respiratorio activado fue significativamente afectado por la dieta, por el tiempo y su interacción. Ambos sexos alcanzaron su valor máximo (1.55, valor promedio) en el segundo muestreo cuando fueron alimentados con 45% PC ($P < 0.05$; Fig. 9).

A)



B)

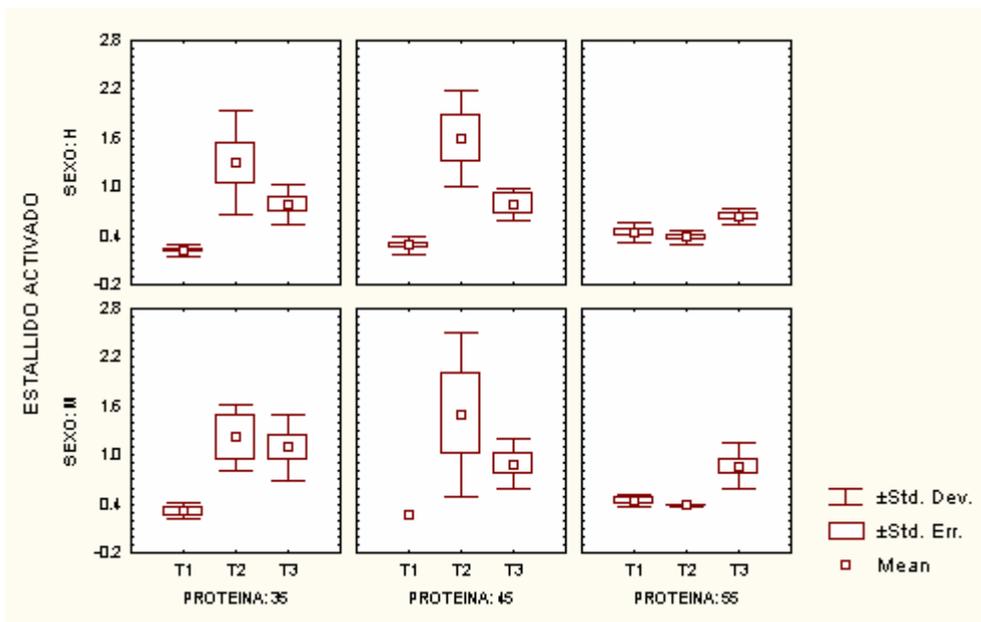


Fig. 9 Variación mensual (3 meses) del estallido respiratorio basal (A) y activado (B) de camarones *L.setiferus* mantenidos en estanques piloto comercial, alimentados con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%). Valor promedio \pm E.S.

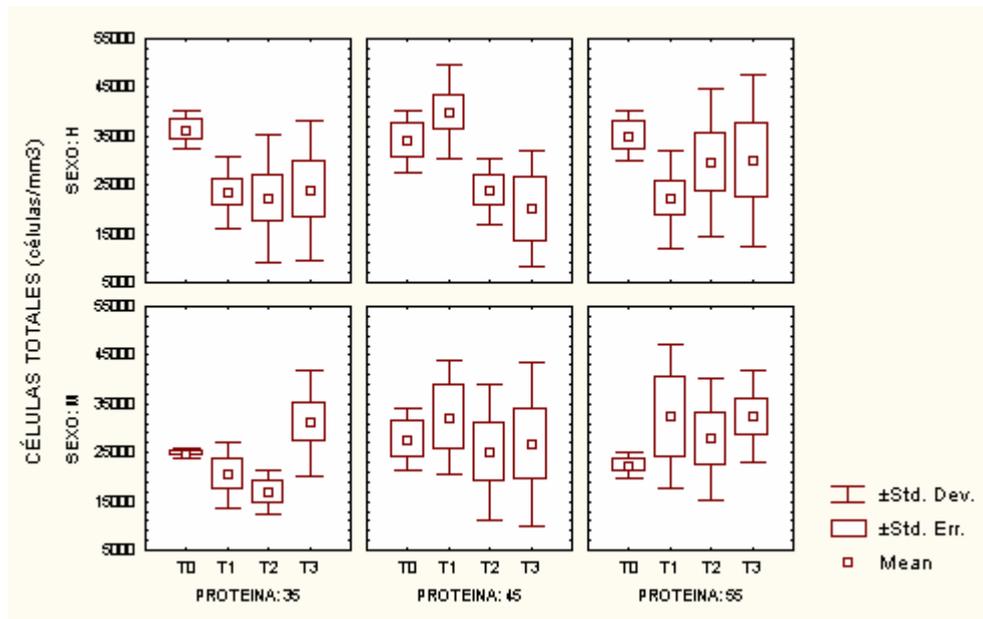
6.3.3 Hemocitos

Los hemocitos totales no mostraron diferencias significativas entre dietas, sexo o el tiempo ($P < 0.05$; Fig. 10) los valores oscilaron entre 5800 a 52600 células por milímetro cúbico (cel/mm^3). Este comportamiento se observó también en las células hialinas con variaciones entre 2800 a 28400 cel/mm^3 . Las células granulares oscilaron de 1400 a 15400 cel/mm^3 mostrando diferencias

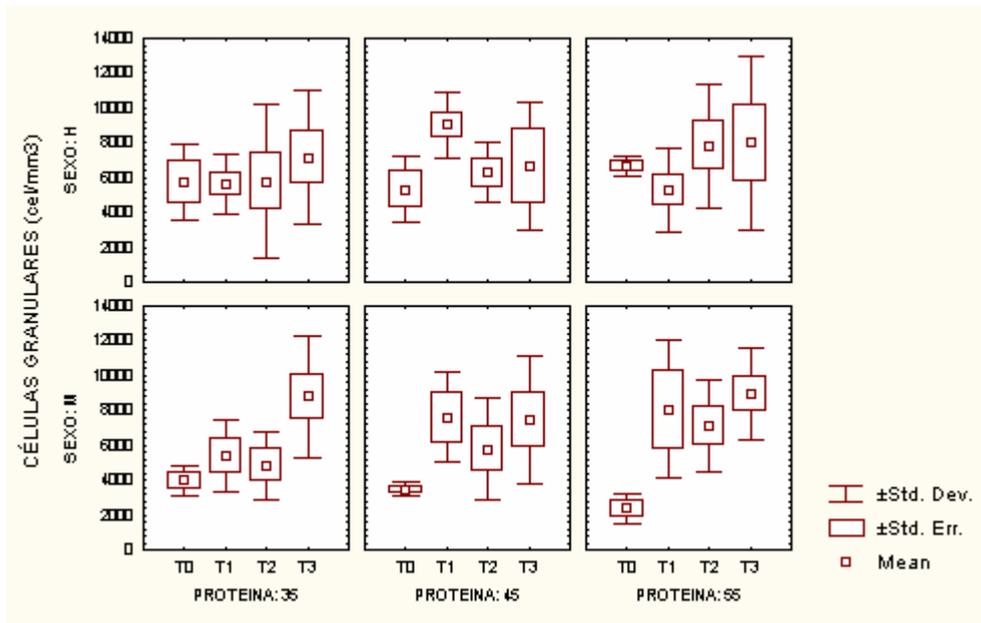
significativas con respecto al tiempo, al igual que las células semigranulares con variaciones de 1200 a 13200 cel/mm³. (P < 0.05; Fig. 10)

Para la obtención de la proporción de fenoloxidasa total en degranulado de hemocitos, se calculó dividiendo los datos de la fenoloxidasa obtenida del degranulado de hemocitos entre la suma total de células granuladas (células granulares + células semigranulares). El análisis por ANOVA de ésta suma, no mostró diferencias significativas con respecto al tiempo, la dieta o el sexo. La proporción de fenoloxidasa total en células granulares totales, varió indistintamente a lo largo del periodo experimental, con datos entre 6.08×10^{-7} a 4.03×10^{-5} . No se encontraron diferencias significativas entre dietas, el tiempo o el sexo (P < 0.05; Fig. 10).

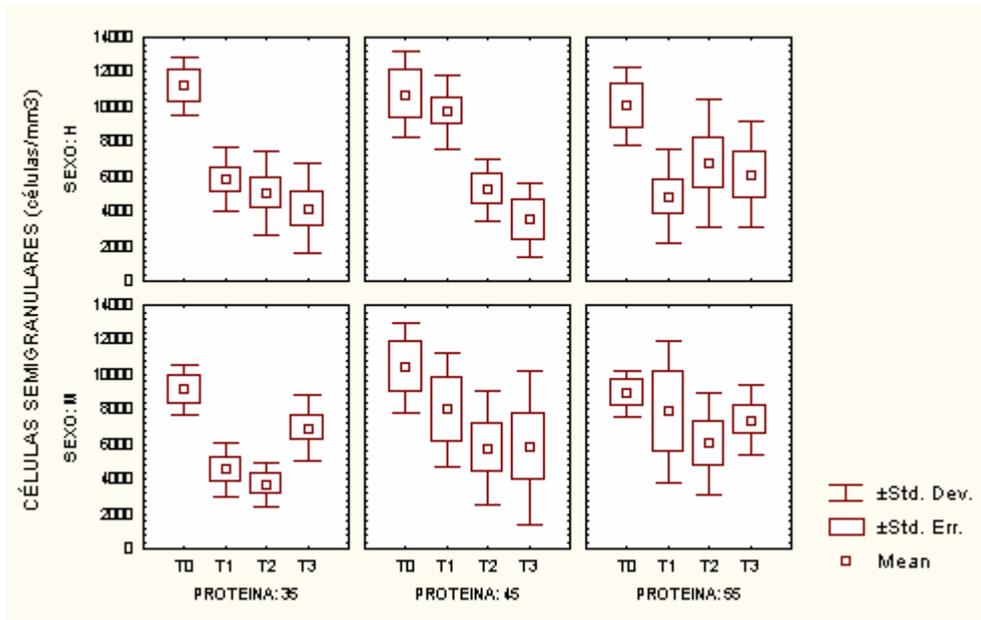
A)



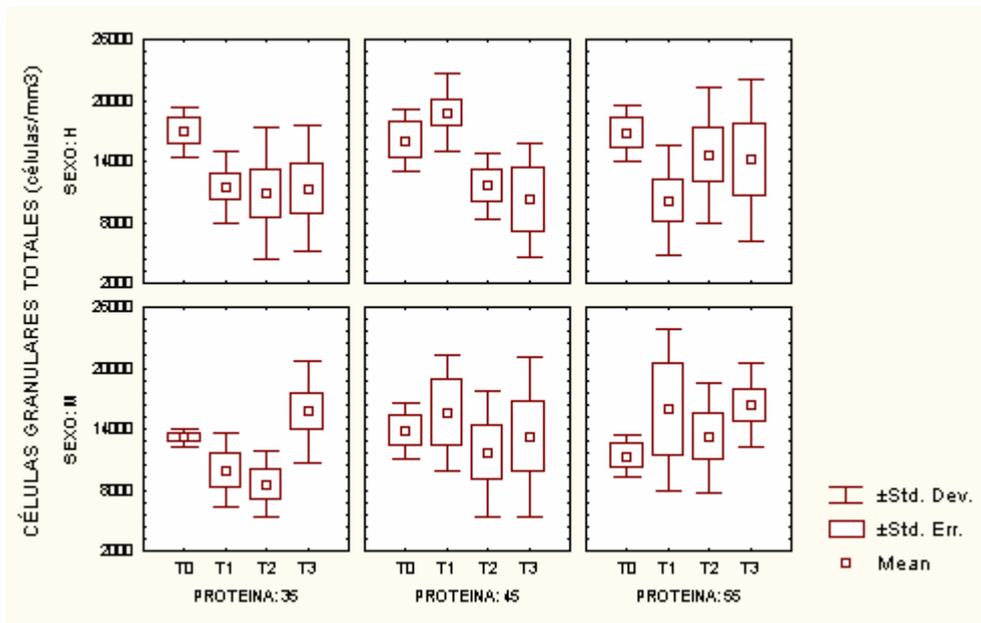
B)



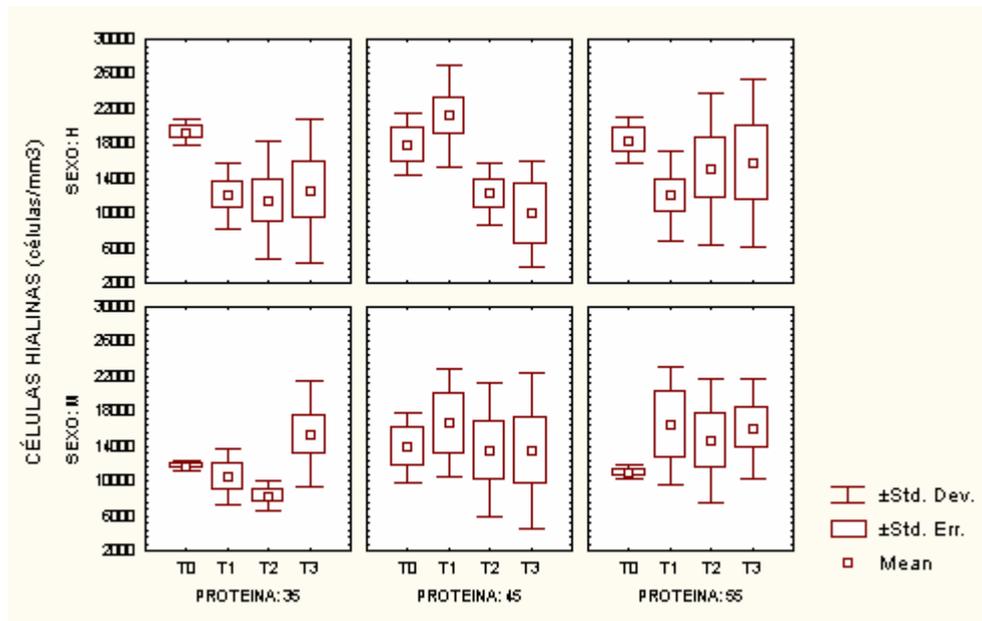
C)



D)



E)



F)

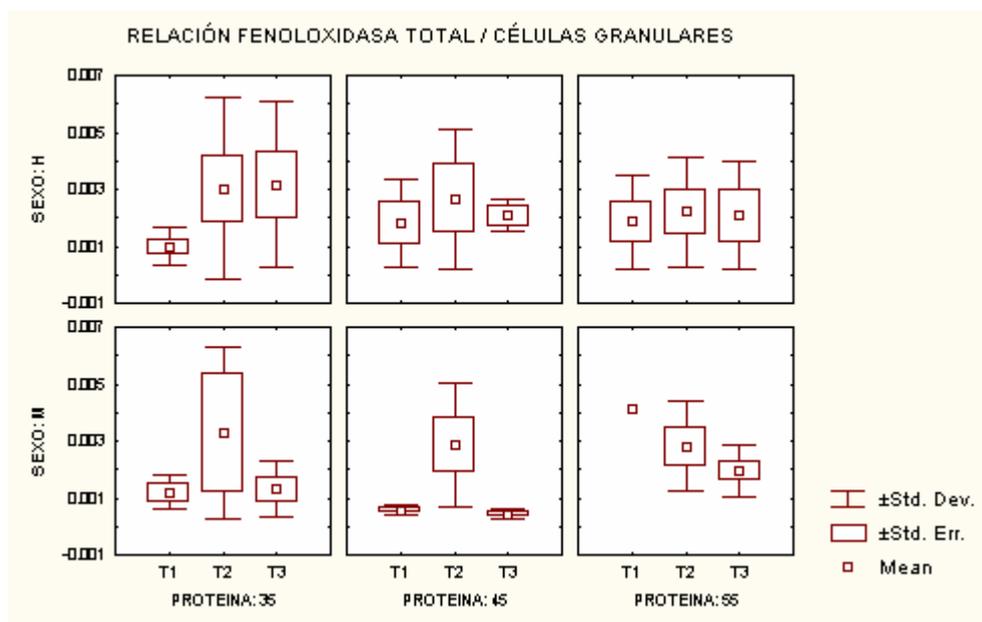


Fig. 10 Variación en el tiempo por 3 meses (T1, T2 y T3), tomando en cuenta la evaluación T0 como punto de referencia de los hemocitos totales (A) de camarones *L.setiferus* mantenidos en estanques piloto comercial, alimentados con distintos niveles de proteína en el alimento (35%, 45%, 55%), clasificados en células granulares (B), células semigranulares (C), granulares totales (D), y hialinas (E). Se obtuvo la relación fenoloxidasa total/células granulares totales (F) Valor promedio \pm E.S.

6.4 Calidad espermática

La calidad espermática expresada en células por espermátforo o por mililitro (cel/ml), fue altamente variable a lo largo del experimento con una gran cantidad de animales sin espermátforo al momento del muestreo. En general la cantidad de células totales por espermátforo aumentó con la edad de los camarones, con valores que fueron de 168,000 cel/ml a 62,790,000 cel/ml, mostrando los valores mayores en el último muestreo (Fig. 11).

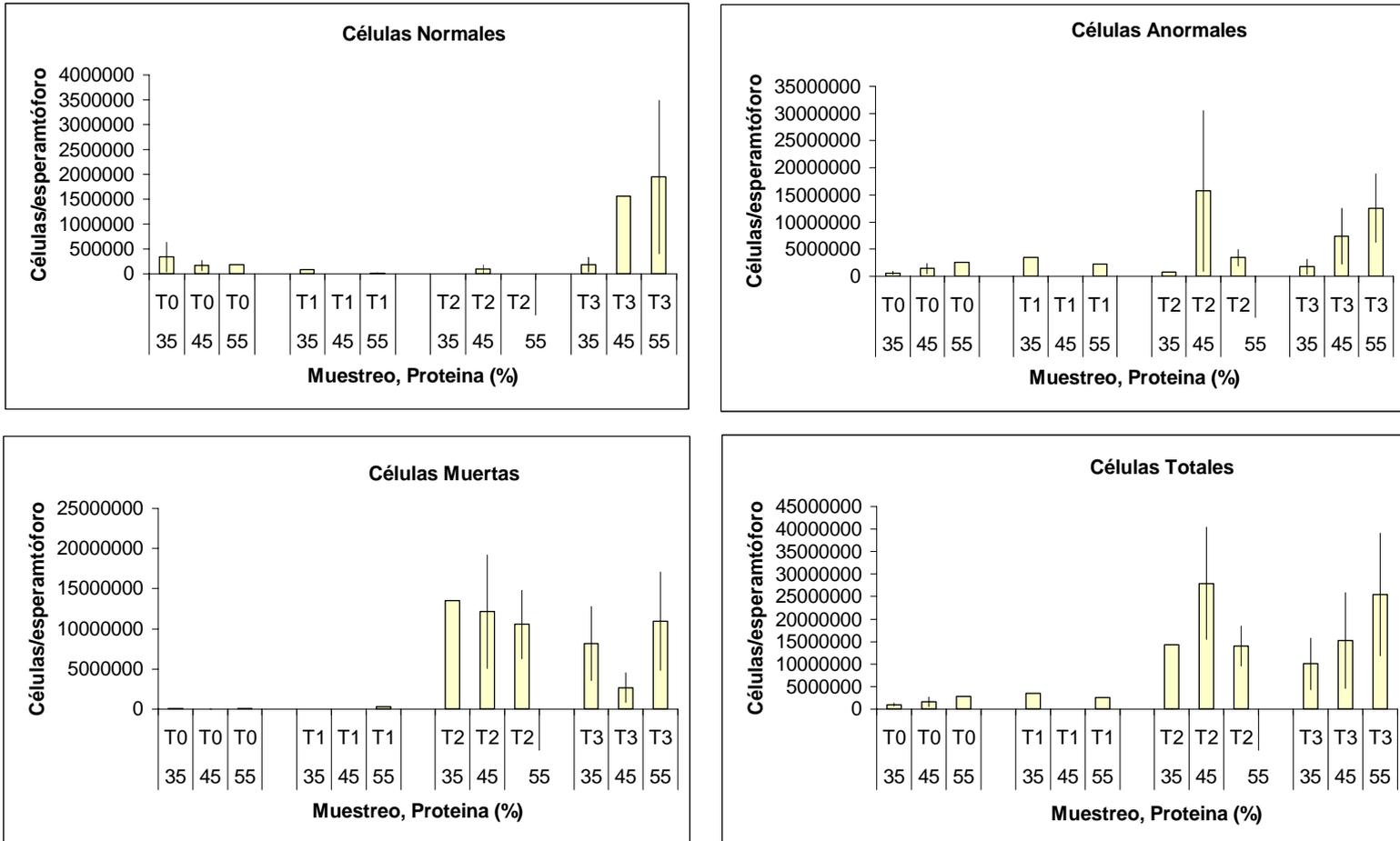


Fig. 11 Efecto de las proteínas en el alimento (35, 45 y 55% PC) sobre las variaciones temporales (con evaluaciones cada mes) por tres meses (T1, T2 y T3) de la calidad espermática en machos adultos de *L. setiferus*, tomando como referencia la primer evaluación (T0). Valores dados como promedio \pm E.S.

Así mismo se observó que la calidad espermática cambió a lo largo del tiempo con una baja proporción de células normales al inicio y un aumento hacia el final de periodo experimental (Fig.12).

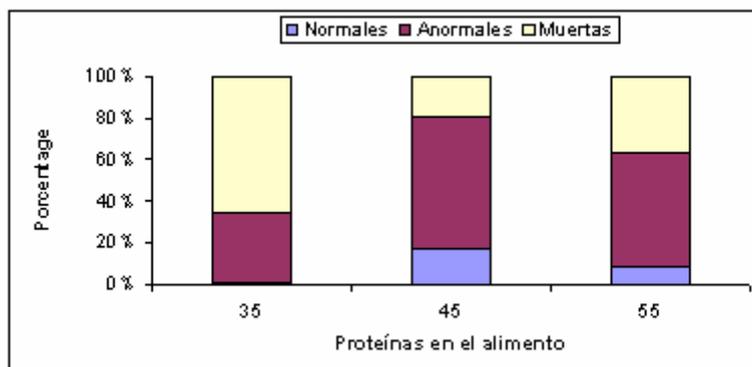


Fig. 12 Proporción de células espermáticas en camarones adultos de *L. setiferus* alimentados con dietas variando el porcentaje de proteína cruda (35, 45 y 55% PC) a lo largo del periodo experimental.

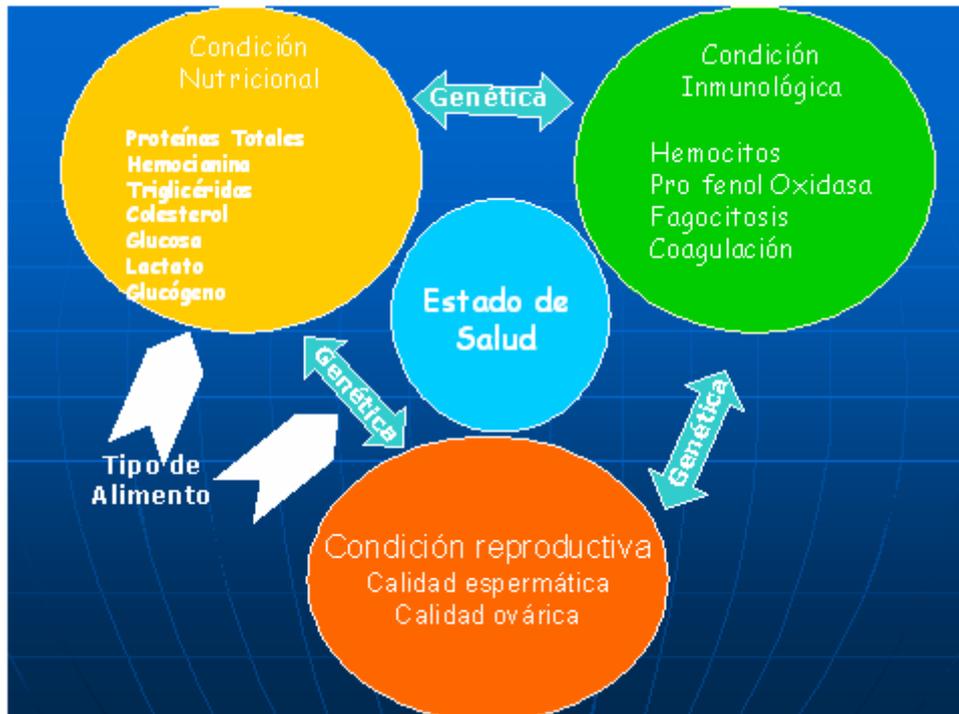
La mayor proporción de células normales (17%) fue registrada en los animales alimentados con 45%PC. Este valor resultó ser 16 veces mayor al observado en los animales alimentados con 35%PC y 2 veces mayor al obtenido en los camarones alimentados con 55%PC.

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni en relación al tiempo de cultivo ($p > 0.05$). Una elevada proporción de células muertas y anormales fue observada en todos los tratamientos con valores que oscilaron entre 19% (45% PC) y 66% (35%PC) y entre 33% (35%PC) y 64% (45%PC), células muertas y anormales, respectivamente (Fig.12).

7.- Discusión

En el presente estudio se observó que las proteínas del alimento ejercieron un efecto significativo sobre la condición inmunológica y la condición reproductiva de adultos de *L. setiferus* cultivados en estanques externos. Un modelo general de la relación entre la condición nutricional, inmune y reproductiva de *L. setiferus* ha sido establecido con el fin de explicar la interrelación que guardan estos elementos en el mantenimiento de la integridad fisiológica de los animales. Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan elementos

para la comprensión del modelo y al mismo tiempo explican la forma en que el alimento modula el estado de salud.



*Modelo general propuesto para explicar la relación entre la condición nutricional, la condición inmunológica y la condición reproductiva de los juveniles de *L. setiferus* cultivados en estanques externos. El fondo azul representa el ambiente en el que los organismos se desarrollan, el cual es dinámico y ofrece, en condiciones de cultivo, un intervalo de posibilidades que pueden o no ser óptimas para el desempeño de la especie. En este modelo, el estado de salud es propuesto como el resultado de la integridad de los organismos en donde las características fisiológicas de la especie están determinadas por la información genética la cual refleja la capacidad adaptativa al alimento, y las condiciones de cultivo. Así mismo el alimento funciona como un agente modulador de la expresión genética interviniendo de forma esencial en el estado de salud de los camarones.*

La condición nutricional de los camarones cultivados no fue afectada por las proteínas de la dieta. Únicamente el tamaño, como resultado del crecimiento y asociado a la fecha de muestreo, mostró un efecto significativo sobre los indicadores sanguíneos utilizados. Aunque estudios recientes llevados a cabo en esta y otras especies en condiciones de laboratorio han demostrado la utilidad en el uso de los niveles de algunos parámetros sanguíneos como indicadores de la condición nutricional (Palacios *et al.*, 1998; Racotta and Palacios, 1998; López *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2003a) no existe información publicada que señale la forma en que estos son afectados por las

características del alimento en animales que tienen acceso tanto al alimento balanceado como al alimento vivo presente en los estanques de cultivo. En un estudio llevado a cabo para evaluar la importancia del alimento balanceado en el contenido estomacal de camarones cultivados (Zatarain, 2000) observó que el alimento pelletizado representó únicamente el 25% mientras que el alimento vivo llegó a ser hasta el 75% del total del alimento ingerido por los camarones. Esto demostró no únicamente que el alimento vivo es ingerido con mayor intensidad en condiciones de cultivo sino además que este puede llegar a ser un elemento importante en la nutrición, pues puede llegar a representar hasta un 57% del total de la proteína cruda ingerida (Watanabe *et al.*, 1983). Así, los resultados obtenidos ahora confirman que, a pesar de utilizar diferentes niveles de proteína en la dieta, los animales tuvieron la posibilidad de compensar esto al ingerir probablemente cantidades importantes del alimento vivo presente, tal y como ha sido reportado en otros estudios.

Es interesante hacer notar que de entre los indicadores de la condición nutricional utilizados ahora, únicamente los niveles de glucógeno de la glándula digestiva fueron afectados por el nivel de proteínas de la dieta, con los valores más altos en los organismos alimentados con 55% y 45%PC. Así mismo se observó que la capacidad osmótica, indicador de la capacidad de los organismos de tolerar cambios en la salinidad, también fue afectada por los niveles de proteínas de la dieta con los valores mayores en aquellos organismos que fueron alimentados con 55%PC. Estudios recientes llevados a cabo con *L. vannamei*, *L. setiferus* y *L. stylirostris* demostraron que en los camarones peneidos en general las proteínas del alimento participan en diversos aspectos del metabolismo de los camarones entre los cuales se encuentran la síntesis de glucógeno y el movimiento del pool libre de amino ácidos (Robertson *et al.*, 1993; Rosas *et al.*, 2000; Rosas *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003a). En esos estudios se observó que los camarones están bien adaptados para sintetizar glucógeno a través de las vías gluconeogénicas, las cuales utilizan a los amino ácidos dietéticos como fuente de moléculas para la síntesis de carbohidratos. Aunque con los resultados obtenidos ahora no es posible establecer la razón por la cual las proteínas de la dieta afectaron los niveles de glucógeno de la glándula digestiva y no los niveles de proteínas o carbohidratos sanguíneos, es posible suponer que algún mecanismo facilitador de la gluconeogénesis pudiera ser estimulado por el alimento artificial.

La forma en que los aminoácidos participan en la capacidad osmótica de los camarones ha sido ampliamente demostrada (Charmantier *et al.*, 1994; Lignot *et al.*, 1999; Lignot *et al.*, 2000). Estudios recientes han demostrado que las proteínas de la dieta también determinan la concentración de amino ácidos libres, ayudando a aumentar o limitando la capacidad osmótica de los camarones (Zanders and Rodríguez, 1992; Chen *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 2000; Rosas *et al.*, 2002; Gaxiola *et al.*, 2005). En estos estudios se ha podido observar que los amino ácidos son frecuentemente transportados en la hemocianina (Hc) la cual es sintetizada en la glándula digestiva, en donde las células F participan de manera activa en la síntesis de esta molécula. Una vez en sangre la Hc transporta los amino ácidos al músculo donde son liberados para formar parte de los componentes intracelulares. Aunque este mecanismo aún no ha sido apropiadamente descrito, las evidencias experimentales

recientes permiten suponer que esta es la forma en que el alimento modula la capacidad osmótica de los camarones (Rosas *et al.*, 2002). Estudios realizados con lizado de hemocitos han señalado que en el interior de las células sanguíneas existen enzimas capaces de activar propiedades especiales a la hemocianina entre las cuales se encuentra su papel como fenol-oxidasa, factor fungiestático y lectina (Destoumieux *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2003; Alpuche *et al.*, 2005). Tomando en cuenta que por la naturaleza de su sistema abierto los hemocitos se encuentran todo el tiempo en contacto con las células de todos los tejidos del camarón es posible esperar que existan enzimas contenidas en estos que favorezcan la liberación de amino ácidos promoviendo su acumulación en las células musculares. Este mecanismo ayudaría a explicar la forma en que los amino ácidos son transportados por la Hc desde la glándula digestiva ayudando a entender el vínculo entre las proteínas de la dieta y la concentración de esta molécula multifuncional.

Los cambios en los niveles de lípidos en la glándula digestiva y en el índice hepatosomático con la edad han sido ampliamente documentados (Sick and Andrews, 1973; Mourente *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1996; Mourente and Rodriguez, 1997; Teshima, 1997). A partir de estos estudios se ha podido establecer que durante la maduración gonádica los camarones movilizan las reservas lipídicas desde la glándula digestiva y el músculo hacia las gónadas con el fin de aportar las reservas que son necesarias para la conformación del tejido reproductivo. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un aumento significativo del índice hepatosmático en los camarones alimentados con 45 % PC indicando que con esa dieta se favoreció la acumulación de reservas. Al hacer el análisis de lípidos totales se observó un valor mayor en los animales alimentados con 45% PC indicando que muy probablemente este alimento favoreció la acumulación de este nutriente. De acuerdo con (Mourente and Rodriguez, 1997) los lípidos acumulados en la glándula digestiva son primero almacenado como acilgliceroles y luego transportados por las lipoproteínas, entre las cuales la vitelogenina tiene un papel importante. Aunque la razón por la cual el alimento con 45% PC favoreció la acumulación de lípidos en la glándula digestiva no puede ser establecida con los resultados obtenidos en este estudio es posible plantear algunas hipótesis basándose en información proveniente de poblaciones silvestres y cultivadas estudiadas anteriormente. (Mourente and Rodriguez, 1997) encontraron que dietas óptimas favorecen el crecimiento y la acumulación de reservas en el vitelo de las hembras, las cuales son capaces de producir progenie más tolerante a cambios de salinidad. Estos autores concluyeron que los ácidos grasos poli-insaturados contenidos en las dietas experimentales eran los responsables de esta condición nutricional en las postlarvas ahí estudiadas.

Aunque la forma en que la condición nutricional y el sistema inmune están vinculadas no ha sido bien establecida existen hipótesis que explican parte de estos mecanismos. El sistema inmune de los camarones es esencialmente proteico pues esta basado en la actividad de enzimas que activan los procesos de coagulación, adhesión celular o que promueven la liberación de péptidos de bajo peso molecular especializados en el ataque a bacterias y hongos (Hernández-López *et al.*, 1996; Gollas-Galvan *et al.*, 1997; Bachere *et al.*, 2000; Destoumieux *et al.*, 2000; Sritunyalucksana and Söderhall, 2000; Vargas-

Albores and Yepiz-Plascencia, 2000; Pascual *et al.*, 2004b). Estudios de laboratorio han demostrado que el nivel de proteínas del alimento modula la intensidad de la respuesta inmune indicando que los procesos de síntesis de estas moléculas son controlados, en parte por el aporte de aminoácidos del alimento (Pascual *et al.*, 2003b; Pascual *et al.*, 2004a; Pascual *et al.*, 2004b; Pascual *et al.*, 2006). A este respecto (Goimier *et al.*, 2006) reportaron que las proteínas de la dieta no solo modulan la condición nutricional de pre adultos machos de *L. setiferus* mantenidos en condiciones controladas, sino también la respuesta inmune. En ese estudio también se observó que el aumento de la respuesta inmune en relación con las proteínas de la dieta no es igual para los intervalos entre 35 y 45% de PC y entre 45 y 55% PC. Los camarones alimentados con 55%PC mostraron una condición inmunológica varias veces mayor a la observada en camarones alimentados con 35 o 45% PC indicando que un exceso en proteínas dietéticas pudieran estar exacerbando los mecanismos de síntesis de los componentes inmunológicos. Es interesante hacer notar que una respuesta similar fue observada en el presente estudio en donde la mayor actividad de los indicadores de la condición inmunológica fue observada en los animales alimentados con altos niveles de proteína en la dieta. Esto es, un efecto significativo de las proteínas de la dieta fue observado tanto en los niveles de células sanguíneas como en sus contenidos y en la actividad fagocítica. Aunque una respuesta de esta naturaleza pudiera ser interpretada como benéfica para el organismos (ya que una mayor condición inmunológica significa una mayor capacidad de defensa) estudios previos han demostrado que un sistema inmune muy activo puede comprometer la capacidad reproductiva de los camarones. Es interesante hacer notar que con los resultados obtenidos en el presente estudio es que por primera vez es posible integrar los efectos del nivel de proteínas de la dieta tanto en la respuesta inmune como en la condición reproductiva, ambas respuestas íntimamente ligadas. En estudios anteriores realizados con machos adultos de *L. setiferus* se observó que las condiciones de cautiverio favorecen una baja calidad espermática la cual posiblemente esté asociada con el estrés. Aunque la definición de estrés puede implicar un gran número de respuestas, algunas de las cuales no fueron medidas en el presente estudio, lo cierto es que los niveles de proteínas del alimento produjeron una condición reproductiva e inmune diferenciada y posiblemente asociada, con el papel que tienen la dieta en la regulación del sistema inmune y la relación que guarda éste con la condición reproductiva de los machos. Una forma de saber la forma en que la condición nutricional e inmune es modulada por las condiciones de cautiverio es realizando comparaciones lo más directas posibles entre poblaciones silvestres y cultivadas. Aunque se sabe que la población de *L. setiferus* que habita en la plataforma continental adyacente a la Laguna de Términos es la población más al sur del rango de distribución natural, estudios de biología pesquera han demostrado que esta población se ha mantenido más o menos estable en los últimos años (Muncy, 1984). En su hábitat natural la población se reproduce exitosamente indicando que la condición fisiológica, inmunológica y reproductiva se mantiene en niveles apropiados para garantizar la perpetuación de la especie. ¿Cuales son las diferencias entre las poblaciones cultivadas y silvestres que pudieran estar impidiendo la producción de bancos de reproductores en condiciones de cautiverio?

En este sentido (Sánchez *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2003b) señalaron que la baja calidad espermática en las poblaciones de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio pudiera estar asociada con la pérdida de la capacidad reguladora del sistema inmune el cual, podría estar atacando de manera directa a las células espermáticas durante el proceso de maduración. Evidencias previas mostraron que la mecanización de las células espermáticas aparece justo cuando estas pasan a través del vaso deferente distal (Dougherty and Dougherty, 1989; Dougherty *et al.*, 1989). Estos autores observaron gotas de melanina en las células espermáticas las cuales reducen la viabilidad celular y afectan la calidad espermática. Bachere (com. Pers) encontró que los hemocitos de camarón suelen infiltrarse en las zonas cercanas al vaso deferente en donde participan en el endurecimiento del espermatóforo justo cuando este forma. Aunque los resultados obtenidos en el presente estudio no son concluyentes, los cambios en los mecanismos de regulación del sistema inmune y la baja calidad espermática observada en los animales alimentados con las dietas altas (55%PC) y bajas (35%PC) en proteína pudieran indicar que tanto por defecto como por exceso las proteínas de la dieta pueden llegar a influir negativamente en la fisiología reproductiva de esta especie. Una consecuencia práctica de esto es que comúnmente los machos adultos de camarón son mantenidos junto con las hembras, en la búsqueda de cópula natural y por ende de desoves viables. Durante la alimentación de los reproductores ambos sexos son alimentados con base en dietas altas en proteínas y ácidos grasos poli-insaturados, los cuales, si bien se sabe favorecen la producción de ovocitos, podrían estar afectando de manera negativa a la calidad espermática de los machos. Un cultivo separado, utilizando alimentos balanceados para machos con un máximo de 45% PC y temperaturas menores de 28°C (Pascual, 2000; Sánchez, 2001; Sánchez *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003b) podrían favorecer una mayor producción de nauplios viables de esta especie importante para el sureste del Golfo de México.

8.- Conclusiones

Conforme se aumenta el nivel de proteína en la dieta de acuerdo al intervalo óptimo de proteínas en camarones adultos de *L. setiferus* cultivados en estanques externos tamaño piloto comercial, se beneficia la calidad fisiológica y aumenta la calidad inmunológica. A pesar de esto, para el caso de los machos no se logra tener un aumento significativo en la calidad espermática.

Una dieta con 45% de proteína cruda suministrada a camarones adultos cultivados de *L. setiferus*, es la más adecuada para mantener a los organismos con un mejor estado de salud, y una buena calidad reproductiva.

El nivel de proteína en la dieta influye en el estado nutricional, y de manera muy significativa en la calidad inmune de camarones *L. setiferus* cultivados en estanques tamaño piloto comercial.

Existe una relación de manera integral entre la condición nutricional, inmune y reproductiva, de modo que si alguna de estas sufre un desequilibrio, las demás se verán afectadas.

Particularmente el nivel de proteína en la dieta de camarones adultos de *L. setiferus* afecta el nivel de glucógeno de manera significativa.

9.- Bibliografía

- Adachi,K., Hirata,T., Nishioka,T., Sakaguchi,M., 2003. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 134B, 135-141.
- Alpuche,J., Pereyra,A., Agundis,C., Rosas,C., Pascual,C., Slomiannyc,M.C., Vazquez,L., Zenteno,E., 2005. 2005. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta* 1724: 86 – 93. *Bichimica et Biophysica Acta* 1724, 86-93.
- Bachere,E., Destoumieux,D., Bulet,P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. pp. 71-88, 20.
- Barclay,M.C., Dall,W., Smith,S.M., 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68, 229-294.
- Bray, W.A. & Lawrence, A.L., 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and Practices*, Elsevier Science Publisher B.V., pp. 93-170. Amsterdam, The Netherlands.
- Brito,R., Chimal, Rosas C., 2000. Effect of salinity in survival, growth and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda; penaeidae). pp. 253-263.
- Britton, J. C., Morton, B., 1989. Shore ecology of the Gulf of México, University of Texas Press, Austin, Texas.
- Browdy, C. L., 1992. A review of the reproductive biology of *Penaeus* species: Perspectives on controlled shrimp maturation systems for high quality nauplii production pp: 22-51. En: J.A. Wyban, editor. *Proceeding of the Special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Brown,A.Jr., Macvey,J., Middleditch,B.S., Lawrence,A.L., 1979. Maturation of white shrimp (*Penaeus setiferus*) in captivity. *World Maricul. Soc.* 10, 435-444.
- Chan, S.-M., Rankin, S. M., Keeley, L.L., 1988. Characterization of the moult stages in *P. vannamei*: Setogenesis and Hemolymph levels of total protein, Ecdysteroids, and glucose. *Biol. Bull.* 175, 185-192.

- Chamberlain, G.W., y Lawrence A.L., 1981. Maturation, reproduction and growth of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* fed natural diets. *J. World aquacult. soc.* 12(1):209-224
- Chamberlain, G.W., and Gervais, F., 1984. Comparisson of unilateral eyestalk ablation with environmental control for ovarian maturation of *Penaeus stylirostris*. *J. World Maricult. Soc.* 15: 29-30
- Charmantier,G., Soyes,C., Aquacop, 1994. Effect of moult stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Ecol.* 178, 223-246.
- Chen,J.C., Cheng,S.Y., 1993. Studies in hemocyanin and hemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol. B* 106, 293-296.
- Chen,J.C., Lin,J.L., 1994. Responses of osmotic and chloride concentrations of *Penaeus chinensis* Osbeck subadults acclimated to different salinity and temperature levels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology [J. Exp. Mar. Biol. Ecol.]* 179(2), 267-278.
- Chen,J.C., Lin,M.-N., Lin,J.Y., Ting,Y.-Y., 1992. Effect of salinity on growth of *Penaeus chinensis* Juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A, 343-346.
- Cheng,M., Su,B., Song,Y., Ye,W., 1996. Studies on chitinase from shrimp head. *Tropic oceanology/Redai Haiyang. Guangzhou [TROP. OCEANOL. /REDAI HAIYANG]* 15(2), 68-73.
- Destoumieux,D., Moñoz,M., Bulet,P., Bachere,E., 2000. Peneidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustace, Decapoda). *Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 1260-1271.
- Destoumieux,D., Saulnier,D., Garnier,J., Jouffrey,C., Bulet,P., Bachere,E., 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 47070-47077.
- Djangmah,J.S., 1970. The effectys of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comp. Biochem. Physiol.* 32, 709-731.
- Dougherty,W.J., Dougherty,M.M., 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm spermatophores of the pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Inver. Phatol.* 54, 331-343.
- Dougherty,W.J., Dougherty,M.M., Harris,S.G., 1989. Electron microscopic observations on melanized spermatophores of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Inver. Phatol.* 54, 344-351.
- Gaxiola,G., Cuzon,G., Garcia,T., Taboada,E., Brito,R., Chimal,M.E., Paredes,C., Soto,L.A., Rosas,C., VanWormhoudt,A., 2005. Factorial effects of salinity,

dietary carbohydrates and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comp. Biochem. Physiol.* 140A, 29-39.

Goimier, Y., Pascual, C., Sánchez, A., Taboada, E., Gaxiola, G., Sánchez, A., Rosas, C., 2006. Relation Between Reproductive, Physiological, And Immunological Conditions Of *L. setiferus* Adult Males Fed Different Dietary Protein Levels. *Animal Reproduction Science*. In Press, Corrected Proof, Available online 9 August 2005.

Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J., Vargas-Albores, F., 1997. Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology, A* [COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. , A] 117A(3), 419-425.

Hagerman, L., Weber, R.E., 1981. Respiratory rate, hemolymph oxygen tension and hemocyanin level in the shrimp *Palaemon adspersus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 54, 13-20.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C(1), 61-66.

<http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2005/noviembre/B329.pdf>

Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J., Levy, P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus*. *Fish & Shellfish Immunology* 8.

Leung-Trujillo, J.R., Lawrence, A.L., 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. *Aquaculture* 65, 363-370.

Lignot, J.H., Cochard, J.C., Soyez, C., Lemaire, P., Charmantier, G., 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 170, 79-92.

Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209-245.

López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A., Rosas, C., 2003. Physiological, nutritional and immunological role of dietary 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, In press.

Margarita Caso, Irene Pisanty, Ezequiel Ecurra, 2004. “ Diagnóstico ambiental del Golfo de México” . Volumen 2, Secretaría de medio ambiente y recursos naturales, Instituto Nacional de Ecología. Instituto de Ecología, A.C. Harte Research Institute for Gulf of México Studies, 789-819.

- Martinez,E., Aguilar,M., Trejo,L., Hernández,I., Díaz-Iglesia,E., Soto,L.A., Sanchez,A., Rosas,C., 1998. Lethal low dissolved oxygen concentrations for postlarvae and early juvenile *Penaeus setiferus* at different salinities and pH. *Journal of the World Aquaculture Society* 29(2), 221-229.
- Mourente,G., Medina,A., González,S., Rodríguez,A., 1994. Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodidae) during maturation. *Marine Biology* 121, 187-197.
- Mourente,G., Rodríguez,A., 1997. Effects of salinity and dietary DHA (22:6n-3) content on lipid composition and performance of *Penaeus kerathurus* postlarvae. *Marine Biology [Mar. Biol.]* 128(2), 289-298.
- Muncy,R.J., 1984. Species profiles life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Atlantic).
- Ogle, J.T., 1992. A review of the current (1992) state of our knowledge concerning reproduction in open thelicum Penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. *Gulf Research Reports*, 22(1-3), 267-274.
- Palacios,E., Ibarra,M.E., Ramírez,J.L., Portillo,G., E.,R., 1998. Biochemical composition of egg and nauplii in white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) in relation to physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquac Research* 29, 183-189.
- Pascual,C., 2000. Caracterización fisiológica e inmunológica de una población de machos adultos del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Linneo, 1767): línea base y efecto del estrés térmico. Facultad de Ciencias, UNAM, pp. 1-85.
- Pascual,C., Arena,L., Cuzon,G., Gaxiola,G., Taboada,G., Valenzuela,M., Rosas,C., 2004a. Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. *Aquaculture* 230, 405-416.
- Pascual,C., Gaxiola,G., Rosas,C., 2003a. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology* 142, 735-745.
- Pascual,C., Sánchez,A., Sánchez,A., Vargas-Albores,F., LeMoullac,G., Rosas,C., 2003b. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637-650.
- Pascual,C., Sánchez,A., Zenteno,E., Cuzon,G., Gaxiola,G., Brito,R., Gelabert,R., Hidalgo,E., Rosas,C., 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Press, Corrected Proof, Available online 10 August 2005.*
- Pascual,C., Zenteno,E., Cuzon,G., Sánchez,A., Gaxiola,G., Taboada,G., Suárez,J., Maldonado,T., Rosas,C., 2004b. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic

- balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture* 236, 431-450.
- Preston, N. P., Burford, M. A., Coman, F. E., Rothlisberg, P. C., 1992. Natural diet of larval *Penaeus merguensis* (Decapoda; Penaeidae) and its effect of survival. *Marine Biology* 113, 181-192
- Primavera, J.H., 1985. A review of maturation and reproduction in closed thelycum penaeids. En: Y.Taki, J.H.Primavera, Llobrera., J.A. (eds.). Proceedings of the First International Conference of the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Iloilo City, Philippines. Pp. 47-64.
- Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 351-356.
- Ramos, L., Vazquez Boucard, C., Oliva, M., Garcia, E., Fernandez, I., 1996. Variations in the total lipids content, lipids and fatty acids class during the ovarian maturation in the *Penaeus schmitti* and *P. notialis*. *Rev. Invest. Mar.* 17(2-3), 157-165.
- Robertson, L., Lawrence, A.L., Castille, F., 1993. Interaction of salinity and protein level on growth of *Penaeus vannamei*. *J. Appl. Aquacult* 2, 43-54.
- Rosas, C., Bolongaro-Crevenna, A., Sanchez, A., Gaxiola, G., Soto, L., Escobar, E., 1995. Role of the digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. *Biol. Bull.* 189, 168-174.
- Rosas, C., Cooper, E.L., Pascual, C., Brito, R., Gelabert, R., Moreno, T., Miranda, G., Sánchez, A., 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae). *Marine Biology* 145, 401-413.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C., Van Wormhoudt, A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 249, 181-198.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., Van Wormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268, 47-67.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Van Wormhoudt, A., 2001. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda ; Penaeidae). *Aquac Research* 32, 1-20.

- Sánchez,A., 2001. Variables metabólicas de la hemolinfa, respuesta inmune y balance energético de machos adultos de *Litopenaeus setiferus* durante la aclimatación (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez,A., Pascual,C., Sánchez A., Vargas-Albores,F., LeMoullac,G., Rosas,C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.
- Sánchez,A., Pascual,C., Sánchez,A., Vargas-Albores,F., LeMoullac,G., Rosas,C., 2002. Acclimation of adult males of *Litopenaeus setiferus* exposed at 27°C and 31°C: Bioenergetic balance. In: Escobar-Briones,E.G., Alvarez,F. (Eds.), *Modern Approaches to the study of crustacea*. Kluwer Academic Press, New York, pp. 45-52.
- Sick,L.V., Andrews,J.W., 1973. The effect of selected dietary lipids, carbohydrates and protein on the growth, survival and body composition of *Penaeus duorarum*. *Proceedings of the World Mariculture Society* 4, 263-276.
- Sritunyalucksana,K., Söderhall,K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53-69.
- Song,Y.L., Hsieh,Y.-T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species. *Developmental & Comparative Immunology [Dev. Comp. Immunol.]* 18(3), 201-209.
- Teshima,S., 1997. Phospholipids and Sterols. In: D´Abramo,L., Conklin,D.E., Akiyama,D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 85-107.
- Van Holde,K., Miller,K.I., Decker,H., 2001. Hemocyanins and invertebrate evolution. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 15563-15566.
- Vargas-Albores,F., Yepiz-Plascencia,G., 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13-21.
- Watanabe,T., Kitajima,C., Fujita,S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* 34, 115-143.
- Wenner, E. L., Beatty, G.R., 1993. Utilization of shallow estuarine habitats in South Carolina, USA, by postlarval and juvenile stages of *Penaeus spp.* (Decapoda; Penaeidae). *Journal Crustacean Biology* 13, 280-295.
- Williams,A.B., 1984. Shrimp, lobsters and crabs of the Atlantic coast of the Eastern US MAine to Florida. Smithsonian Institution Press.
- Wyban, J.A. y Sweeney, J.N. 1991. Intensive shrimp production technology. High Health Aquaculture Inc., Hawaii. 158 pp.

Zanders,I., R3driquez,J., 1992. Effects of temperature and salinity stress on osmoionic regulation in adults and on oxygen consumption in larvae and adults of *Macrobrachium amazonicum*(Decapoda,Palemonidae). Com. Biochem. Physiol. 101A(3), 505-509.

Zatarain,M., 2000. Evaluaci3n del uso de inductores de zooplancton en el cultivo semiintensivo del camar3n azul, *Litopenaeus stylirostris*. Universidad Aut3noma de Sinaloa, pp. 1-87.

10 ANEXOS

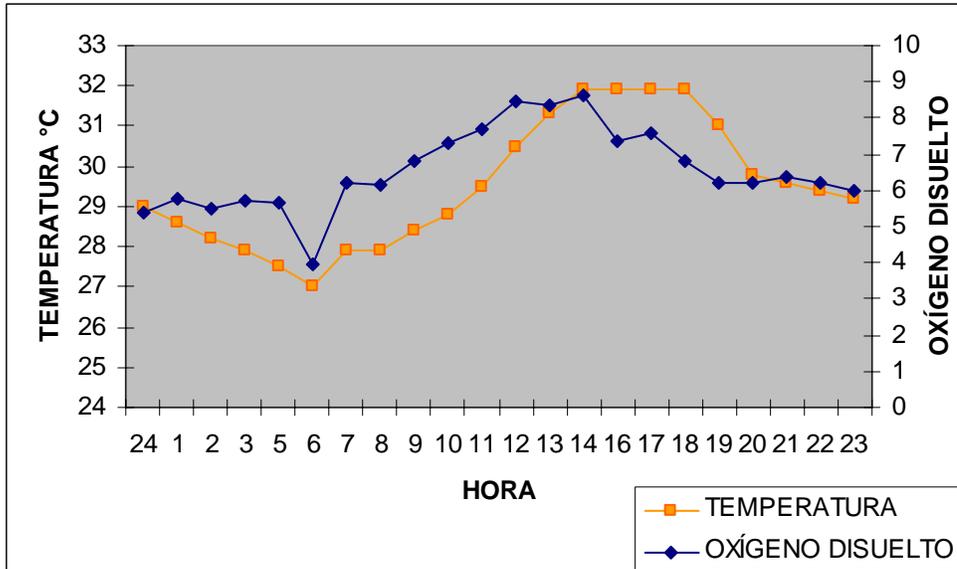


Fig. 10.1 Oscilación de temperatura y oxígeno en un periodo de 24 hrs

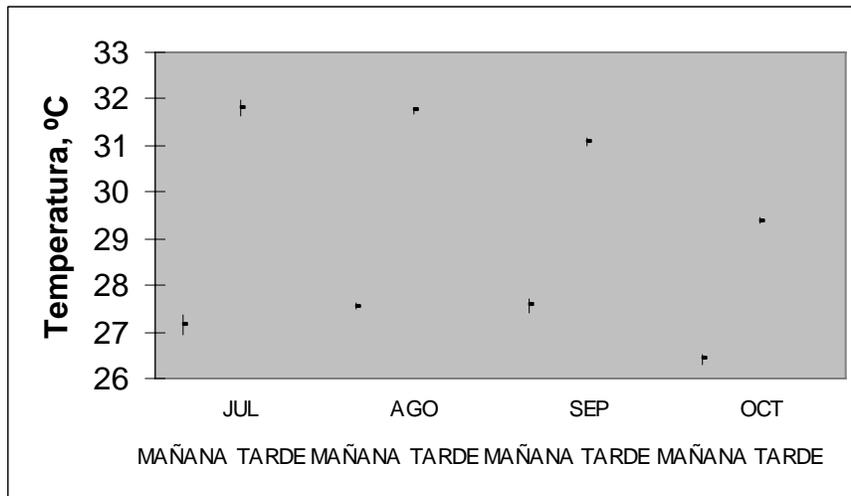
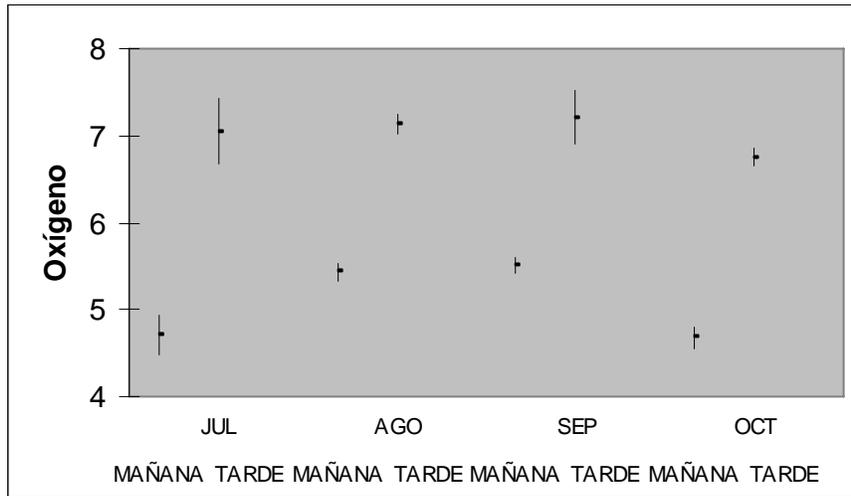


Fig.10.2 Variación mensual de datos de oxígeno disuelto (A) y temperatura en °C (B) en los estanques tamaño piloto comercial utilizados en el presente estudio.



Fig. 10.3 Datos de salinidad en los estanques experimentales durante el periodo del estudio (Julio del 2004 a Octubre del mismo año)

Tabla 10.1 Número de organismos machos y hembras adultos de *L. setiferus* evaluados en los distintos tiempos del periodo experimental (T0,T1,T2 y T3)

MUESTREO	SEXO	DIETA	ORGANISMOS
T0	M	PURINA	9
	H	PURINA	9
T1	M	35%	4
		45%	3
		55%	4
	H	35%	6
		45%	8
		55%	8
T2	M	35%	4
		45%	5
		55%	5
	H	35%	7
		45%	4
		55%	6
T3	M	35%	7
		45%	5
		55%	7
	H	35%	6
		45%	3
		55%	5

Tabla 10.2 Valores significativos ($P < 0.05$) resultado del análisis estadístico (ANOVA multivariado) de datos de camarones adultos de *L. setiferus* mantenidos en cautiverio.

Indicadores		Proteína		Interacción	Interacción	Interacción	Interacción
Metrológicas	Muestreo (M)	Cruda (PC)	Sexo (S)	M / PC	M / S	PC / S	M / PC / S
Peso	p < 0.05						
Talla	p < 0.05						
Presión Osmótica (PO)							
Indicadores							
Fisiológicos							
Capacidad Osmótica (CO)	p < 0.05	p < 0.05		p < 0.05			
Proteína (P)	p < 0.05						
Hemocianina (HC)	p < 0.05						
Relación P / HC	p < 0.05						
Glucosa				p < 0.05			
Lactato	p < 0.05						
Glucógeno	p < 0.05	p < 0.05		p < 0.05			p < 0.05
Acilglicéridos	p < 0.05						
Colesterol	p < 0.05						
Índice Hepatosomático	p < 0.05		p < 0.05				
Lípidos en hepatopáncreas	p < 0.05						
Lípidos en músculo							
Indicadores Inmunológicos							
Hemaglutinación		p < 0.05					
Fenoxidasa total (FOGR)							
Fenoxidasa (FO)				p < 0.05			
Estallido Basal	p < 0.05			p < 0.05			
Estallido Activado	p < 0.05	p < 0.05		p < 0.05			
Hemocitos							
Células Granulares (Gr)	p < 0.05						
Células Semigranulares	p < 0.05						
Células Hialinas (H)							
Células Totales (C Tot)							
Células Totales Granuladas							
Proporción PROFO / Gr							
Células espermáticas							
Células normales							
Células anormales							
Células muertas							
Células totales							