

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



Influencia del estrés por hipertermia a corto plazo sobre índices fisiológicos, inmunológicos y celulares en camarón blanco

Litopenaeus vannamei

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias

(Biología Marina)

p r e s e n t a

Biól. Atzin Carreño Mejía

Directores de Tesis: Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Comité Tutorial: Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés

Dra. Elena Palacios Mechetnov

México, D.F., enero del 2009



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.

A Edahito,

el viento que endulza mi vida,

a nosotros tres,

a lo que dejamos.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado, que me permitió la realización de la maestría.

Mi más sincero agradecimiento al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, así como a su personal académico y administrativo por su valioso apoyo brindado para la realización de este trabajo, que hizo posible mi traslado a La Paz, la asistencia a cursos y a un congreso.

A los proyectos que financiaron el desarrollo de esta tesis: CONACyT 43249 y SAGARPA-CONACyT, 2004-044.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante la parte final de este trabajo.

A mis directores de tesis, Dr. Ilie S. Racotta Dimitrov y Dr. Dariel Tovar Ramírez por la oportunidad de realizar este proyecto, por su paciencia y la calidad de sus comentarios que trascendieron en mi formación académica. En particular al Dr. Racotta por el financiamiento brindado para concluir este trabajo y asistir al congreso.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Ana María Ibarra Humphries, Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Dra. Elena Palacios Mechetnov por sus valiosos comentarios y la asesoría brindada durante la realización de esta tesis.

Al programa de mejoramiento genético del CIBNOR por la donación de organismos. Al equipo del laboratorio "húmedo" de Genética Acuícola y personal técnico del área de raceways, a Pablo Monsalvo y Marcos Quiñones por su valiosa orientación y apoyo brindado en el manejo y mantenimiento de los camarones.

A todos los técnicos de cada uno de los laboratorios en que me permitieron hacer parte de mi tesis: Roberto Hernández, Hever Latisnere, Jesús Neftali Gutiérrez, Griselda Gallegos y Patricia Hinojosa, agradezco su apoyo y enseñanzas. En especial agradezco a Olivia Arjona por su valiosa ayuda durante los muestreos, por sus ánimos para seguir con este trabajo y sobre todo por su amistad.

A Horacio Sandoval y Manuel del laboratorio de cómputo del CIBNOR, por las facilidades otorgadas para la elaboración de este escrito.

A mi maestra de técnicas inmunológicas Laurence, por sus enseñanzas y apoyo durante los muestreos y a mis demás compañeros de laboratorio: Marthita, Mónica, Miguel, Poli, Vero y Rosy por hacer agradable mi estancia en el CIB.

A mis papás por traernos luz y rumbo cuando parece que las fuerzas se han agotado y sobre todo por estar siempre tan cerca sin importar la distancia.

A mi enanito por tu paciencia, por comprender mis ausencias y por tu ejemplo de valentía. A Rubén por decidir emprender este camino juntos, por todo tu apoyo y comprensión, gracias, mi eterno amigo por ser junto con Edahi la motivación de mis días.

Finalmente agradezco a mis hermanos, familiares y amigos por darme ánimos para concluir este trabajo.

Resumen

La incidencia de enfermedades en los cultivos de camarón representa una de las principales limitantes para su intensificación. Se reconoce que el estrés juega un papel crucial en la susceptibilidad de los organismos a las enfermedades, por lo tanto, conocer la modulación de ciertas variables celulares, metabólicas e inmunes en respuesta a diversas condiciones de estrés, permitirá encontrar indicadores tempranos del estado de salud del organismo. En el presente trabajo se analizó la influencia del estrés agudo por hipertermia a nivel molecular, fisiológico e inmunológico en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Para alcanzar este objetivo, se realizaron tres experimentos. En el primer bioensayo los camarones fueron sometidos a un incremento abrupto de temperatura, de 28 a 32°C (grupo ST 32°C) en un lapso de una hora, permaneciendo a esa máxima temperatura por dos horas más. En el segundo bioensayo, el incremento fue de 28 a 35°C (ST 35°C). Al cabo de este tiempo, los organismos de ambos experimentos junto con sus controles experimentales (3 hrs a 28°C), fueron muestreados considerando su estadio de muda. La respuesta fisiológica en hemolinfa (proteínas totales, hemocianina, glucosa, lactato, triglicéridos y osmolaridad) además del tiempo de coagulación fueron analizados. En el segundo bioensayo también se analizó la respuesta fisiológica (proteínas totales, glucógeno, lactato, lípidos totales y triglicéridos) en músculo y hepatopáncreas, además de evaluar algunas variables inmunes (estallido respiratorio, conteo total de hemocitos y actividad de superóxido dismutasa). En el tercer bioensayo se utilizaron tres grupos: el Control y los dos grupos de estrés; ST 32°C y ST 35°C. En este experimento, a diferencia de los anteriores, sólo se consideraron camarones en fase de intermuda para evaluar la expresión génica de Hsp70 y MnSOD por incremento de temperatura.

En respuesta a la condición de estrés por hipertermia a corto plazo se observó un aumento en la demanda energética de *L. vannamei*, promoviendo una respuesta fisiológica representada por hiperglicemia, en conjunto con una disminución en los niveles de proteínas totales y hemocianina circulante por efecto de hipertermia a 32°C. A 35°C se alcanzó un límite fisiológico donde las reservas de glucosa y proteínas totales en hemolinfa son reducidas significativamente sin presentarse un reabastecimiento que permita tener combustible metabólico circulante disponible. La condición de estrés a 35°C también afectó la capacidad osmorreguladora e inmune del organismo, caracterizada por una supresión del sistema oxidante-antioxidante (actividad SOD y producción de anión superóxido) y del CTH. En algunos casos, el estadio de muda presentó un efecto aislado o de interacción con la condición de estrés, lo que nos permitió observar que la mayoría de las alteraciones en las variables analizadas se dan fuera de la intermuda, sugiriendo que el camarón blanco alcanza su mayor estabilidad metabólica e inmunológica en intermuda, siendo el estadio óptimo para la manipulación o transportación de los camarones a nivel de cultivo. Contrariamente a lo esperado, no se detectó una sobre-expresión significativa de Hsp70 y MnSOD promovida por hipertermia, por lo que se recomienda llevar a cabo muestreos en un mayor número de organismos, a diferentes tiempos y en distintos tejidos, con el fin de determinar de manera más precisa los patrones de expresión de estos genes. A partir de estos resultados, se propone que los niveles de glucosa y de proteínas totales, la capacidad osmorreguladora, la actividad de SOD, la producción de anión superóxido y el CTH, pueden representar indicadores sensibles de estrés por hipertermia aguda. Estos indicadores pueden constituir una herramienta que permita tener un panorama más amplio sobre el estado de salud del organismo en respuesta a un determinado factor de estrés en condiciones de cultivo comercial.

Palabras clave: Estrés, hipertermia, *L. vannamei*, respuesta inmune, expresión de MnSOD y Hsp70.

Abstract

Increased incidence of disease during shrimp culturing represents one of the main restrictions to intensifying production. It is accepted that stress increases the susceptibility of shrimp to diseases. Hence, knowledge on modulation of cellular, metabolic, and immune responses to different stress conditions, will allow the recognition of early indicators of shrimp health. In this study, we investigated several physiological, cellular, and immunological responses in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* after exposure to acute hyperthermic stress through three experiments. In the first, shrimp were exposed to an abrupt increase in temperature from 28 to 32°C (ST 32 °C) within one hour and held at the high temperature for two hours. In the second, temperature was increased from 28 to 35 °C. Shrimps exposed to 28 °C for 3 hours served as the control. At the end of this time, shrimp from the two experiments were sampled, recording their molting stage. Hemolymph physiological response (total proteins, hemocyanin, glucose, lactate, triglycerides, and osmolarity) and clotting time were analyzed. In the second experiment, the physiological response (total proteins, glycogen, lactate, total lipids, and triglycerides) was also assessed in muscle and hepatopancreas and some immune variables (respiratory burst, total hemocyte count, and superoxide dismutase activity) were also analyzed. For the third experiment, three groups were used: Control, ST 32 °C, and ST 35 °C. These groups were exposed to the same conditions described previously. In this experiment, unlike the previous ones, we considered only shrimp during intermolt stage and gene expression of Hsp70 and MnSOD were analyzed in hemocytes.

In response to short-term hyperthermic stress, we observed an increase in energy requirements compensated by hyperglycemia and a decrease in circulating levels of total proteins and hemocyanin in response to 32 °C stress. At 35 °C, a physiological limit was probably attained, and hemolymph reserves, such as glucose and total proteins, were significantly reduced without replenishment from tissue reserves. Stress condition at 35 °C also affected the osmoregulatory and immune capacity of shrimp, as indicated by a suppression of the oxidant-antioxidant system (SOD activity and respiratory burst) and the total hemocyte count. In some cases, molting had an interacting effect with the stress condition, which indicated that most physiological or immunological variations do not occur during intermolt, suggesting that whiteleg shrimp reach their highest metabolic and immunologic stability at Stage C; hence, this stage is optimal for handling and shipping shrimp for culturing conditions. Contrary to our expectations, no significant increase in the expression of Hsp70 and MnSOD in shrimp hemocytes occurred after induction of hyperthermia. We recommend that these variables should be analyzed on a larger number of organisms, at different exposure times and on several tissues to obtain a broader response. From these results, we propose that hemolymph glucose, total proteins, and osmoregulatory capacity, as well as SOD activity, respiratory burst, and total hemocyte count are sensitive stress indicators of acute hyperthermia and provide a potential tool to determine health status of shrimp in response to a stress factor.

Key words: Stress, hyperthermia, *Litopenaeus vannamei*, immune response, MnSOD expression, Hsp70 expression

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Resumen	
Abstract	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Ubicación taxonómica	3
2.2 Características de la especie	3
2.3 Estrés de Organismos Acuáticos en Cultivo	4
Factores Internos	4
Factores Externos	6
2.4 Respuesta al estrés	8
Respuesta primaria	8
Respuesta secundaria	9
Respuesta terciaria	9
2.5 Proteínas de Shock Térmico (HSP)	11
2.6 Sistema Inmune de Crustáceos	14
Respuesta celular	15
Respuesta humoral	17
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	20
VI. METODOLOGÍA	21
6.1 Organismos y condiciones experimentales	21
6.1.1 Mantenimiento y aclimatación de organismos	21
6.1.2 Condiciones de estrés por hipertermia	21
6.2 Diseño experimental	22
6.2.1 Primer bioensayo:	22
incremento de temperatura de 28 a 32°C	
6.2.2 Segundo bioensayo:	22
incremento de temperatura de 28 a 35°C	
6.2.3 Tercer bioensayo:	22
Respuesta de la expresión génica por incremento	
de temperatura de 28 a 32°C y de 28 a 35°C	
6.2.4 Parámetros fisicoquímicos del agua	23
6.3 Muestreo de los organismos	24
6.3.1 Variables fisiológicas	24
6.3.2 Actividad de superóxido dismutasa	25

	Páginas	
6.3.3	Variables inmunes	25
6.3.4	Obtención de mARN	25
6.4	Métodos analíticos	26
6.4.1	Variables fisiológicas en hemolinfa	26
6.4.2	Variables fisiológicas en tejidos	28
6.4.3	Actividad de superóxido dismutasa	30
6.4.4	Variables inmunológicas	31
6.4.5	Extracción de ARN	32
6.4.6	Retrotranscripción	33
6.4.7	Oligonucleótidos para la detección de Hsp 70 y MnSOD	33
6.4.8	Detección de Hsp70 y MnSOD en cADN de camarón por PCR punto final	34
6.4.9	Determinación de la secuencia que codifica para Hsp70 en cADN de camarón	35
6.4.10	Sondas para la cuantificación de transcritos de Hsp 70 y MnSOD	36
6.4.11	Cuantificación de transcritos de Hsp70 y MnSOD por RT-PCR	36
6.5	Análisis Estadístico	39
VII. RESULTADOS		40
7.1	Primer Bioensayo. Estrés por hipertermia a corto plazo:28–32°C	40
7.1.1	Oxígeno Disuelto	40
7.1.2	Variables fisiológicas en hemolinfa	41
7.1.3	Variables inmunológicas	43
7.2	Segundo Bioensayo. Estrés por hipertermia a corto plazo: 28 – 35°C	44
7.2.1	Oxígeno Disuelto	44
7.2.2	Variables fisiológicas en hemolinfa	45
7.2.3	Variables fisiológicas en tejidos	48
7.2.4	Actividad superóxido dismutasa (SOD)	51
7.2.5	Variables inmunológicas	53
7.3	Tercer Bioensayo. Respuesta de la expresión génica por hipertermia a corto plazo: 28 – 32°C y 28 – 35°C.	56
7.3.1	Oligonucleótidos para la detección de Hsp70 y MnSOD	56
7.3.2	Obtención y análisis de la secuencia parcial codificante para Hsp 70	56
7.3.3	Detección de Hsp70 y MnSOD de mRNA en muestras de camarón	59
7.3.4	Validación de ensayos de PCR en tiempo real	59
7.3.5	Expresión génica: Cuantificación de trasncritos por PCR en tiempo real	63

	Páginas
VIII. DISCUSIÓN	64
8.1 Temperatura y oxígeno disuelto	64
8.2 Respuesta fisiológica	68
8.2.1 Lactato	68
8.2.2 Glucosa y glucógeno	70
8.2.3 Lípidos totales y triglicéridos	75
8.2.4 Proteínas totales, hemocianina y expresión de Hsp70	77
8.2.5 Presión osmótica	82
8.3 Respuesta inmune	84
8.3.1 Conteo total de hemocitos	84
8.3.2 Anión superóxido	86
8.3.3 Actividad y expresión de superóxido dismutasa	88
8.3.4 Tiempo de coagulación (TC)	90
8.4 Panorama Integral y cumplimiento de hipótesis	92
IX. CONCLUSIONES	93
Perspectivas para futuras investigaciones sobre el tema	94
X. REFERENCIAS	95
XI. ANEXOS	109
ANEXO I. Estandarización de la técnica para cuantificación de la actividad de SOD en hemocitos y plasma	109
ANEXO II. Comparación de respuesta al estrés entre grupos Control Absoluto y Control del Bioensayo 1: 28 a 32°C	112
ANEXO III. Registro del peso de los organismos del bioensayo 1 y 2	113
ANEXO IV. Análisis de secuencias de Hsp70 de DNA plasmídico	114

ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1	Producción de camarón en México por captura y acuicultura; 1985 a 2006.	2
Figura 2	Interacción de variables que afectan la salud en crustáceos.	4
Figura 3	Mecanismo de activación de Hsp70 por las principales señales fisiológicas o estresores que inducen su síntesis.	12
Figura 4	Secuencia del diseño experimental.	23
Figura 5	Concentración de oxígeno disuelto en unidades experimentales sometidas a diferentes temperaturas durante el primer bioensayo.	40
Figura 6	Variables fisiológicas en hemolinfa de camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el primer bioensayo.	42
Figura 7	Concentración de triglicéridos en hemolinfa de camarones en distintos estadios de muda, durante el primer bioensayo.	43
Figura 8	Concentración de oxígeno disuelto en unidades experimentales sometidas a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	44
Figura 9	Variables fisiológicas en hemolinfa de camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo	46
Figura 10	Concentración de glucosa en hemolinfa por estadios de muda en <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	47
Figura 11	Concentración de proteínas totales en hemolinfa de camarones en distintos estadios de muda, durante el segundo bioensayo.	47
Figura 12	Presión osmótica en hemolinfa de camarones en distintos estadios de muda, durante el segundo bioensayo.	48
Figura 13	Variables fisiológicas en hepatopáncreas de camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	49
Figura 14	Variables fisiológicas en músculo de camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	51
Figura 15	Actividad de superóxido dismutasa en camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	52
Figura 16	Variables inmunes en camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo	54
Figura 17	Producción de anión superóxido en hemocitos (medias individuales) por estadios de muda en camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	55
Figura 18	Conteo total de hemocitos (medias individuales) por estadios de muda en camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	55
Figura 19	Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de amplificación a partir de cDNA de hepatopáncreas de camarón.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
Figura 20	Secuencia parcial de nucleótidos de 191 pb, que codifica para Hsp70, obtenida a partir de cDNA de hepatopáncreas de <i>Litopenaeus vannamei</i> .	57
Figura 21	Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de amplificación a partir del cDNA de las muestras de los distintos tejidos: hepatopáncreas y hemocitos.	59
Figura 22	Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de PCR con oligos M13 y DNA plasmídico clonado para la elaboración de las curvas estándar.	59
Figura 23	Amplificación por RT-PCR de las diluciones seriales de DNA plasmídico para los 3 distintos genes.	60
Figura 24	Curvas estándar de 18s, Hsp 70 y MnSOD para evaluar la eficiencia de amplificación.	61
Figura 25	Eficiencia relativa entre el gen blanco (Hsp o MnSOD) y el gen de control endógeno (18s).	62
Figura 26	Expresión génica. Niveles relativos de transcritos de RNAm para Hsp 70 y MnSOD en hemocitos de camarones sometidos a diferentes temperaturas durante el tercer bioensayo.	63
Figura I	Cinética de la actividad de SOD en un lapso de tiempo de 5 minutos en muestras de hemocitos de camarón que recibieron distintos procesos de lisado.	110
Figura II	Cinética del cambio de absorbancia a 550 nm (soluc. reactiva+muestra+XO) en un lapso de tiempo de 5 minutos, en muestras de plasma de camarón, separadas a partir de hemocitos que recibieron distintos procesos de lisado.	111
Figura III	Alineación de 5 secuencias parciales de Hsp70 obtenidas a partir de distintos tejidos.	114
Figura IV	Comparación y porcentaje de homología entre la secuencia obtenida de Hsp 70 de camarón y la de <i>Mycteroperca rosacea</i> .	115

ÍNDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1	Efecto de diversos estímulos de estrés sobre variables fisiológicas evaluadas en distintas especies de camarón.	10
Tabla 2	Efecto de diversos estímulos de estrés sobre la expresión de Hsp70 o Hsc70 en distintas especies de camarón.	14
Tabla 3	Efecto de diversos estímulos de estrés sobre las variables inmunes evaluadas en distintas especies de camarón.	19
Tabla 4	Número de organismos muestreados para la determinación de las distintas variables.	26
Tabla 5	Secuencia de los primers utilizados para la detección de Hsp 70 y MnSOD en cADN de camarón.	34
Tabla 6	Condiciones de PCR utilizado para la amplificación de las secuencias MnSOD y Hsp70.	35
Tabla 7	Secuencia de las sondas utilizadas para la cuantificación de Hsp 70 y MnSOD en cADN de camarón.	36
Tabla 8	Mezcla para una reacción de RT-PCR.	38
Tabla 9	Parámetros del ciclo térmico que se utilizó para la amplificación de las secuencias de 18s, MnSOD y Hsp70 en RT-PCR.	38
Tabla 10	Variables fisiológicas en hemolinfa en los distintos estadios de muda de <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el primer bioensayo.	41
Tabla 11	Tiempo de coagulación en hemolinfa en los distintos estadios de muda de <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el primer bioensayo.	43
Tabla 12	Variables fisiológicas en hemolinfa en los distintos estadios de muda de <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	45
Tabla 13	Variables fisiológicas en hepatopáncreas en los distintos estadios de muda de <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	48
Tabla 14	Variables fisiológicas en músculo en los distintos estadios de muda de <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	50
Tabla 15	Actividad de superóxido dismutasa en los distintos estadios de muda de <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	52
Tabla 16	Variables inmunológicas en hemolinfa en los distintos estadios de muda de <i>L. vannamei</i> sometidos a diferentes temperaturas durante el segundo bioensayo.	53
Tabla 17	Comparación y porcentaje de homología entre la secuencia obtenida de Hsp 70 y la de otras especies en una base de datos general y dentro del subphylum Crustacea.	57

ÍNDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 18	Comparación y porcentaje de homología entre la secuencia deducida de aminoácidos correspondientes a Hsp 70 con la de otras especies del phylum Arthropoda.	58
Tabla 19	Comparación de los efectos que resultaron significativos en ambas condiciones de hipertermia sobre las diferentes variables analizadas.	67
Tabla 20	Punto crítico de oxígeno a diferentes temperaturas y salinidades en especies de camarones peneidos.	68
Tabla 21	Niveles de glucosa en hemolinfa en condiciones basales y por diversos factores de estrés en distintas especies de camarón.	71
Tabla I	Comparación de las variables fisiológicas y tiempo de coagulación entre grupos control (CA y C).	112
Tabla II	Media del peso en gramos \pm error estándar de los camarones muestreados.	113

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura representa para los países de América Latina y el Caribe una fuente importante de ingresos provenientes de las exportaciones, fuentes de empleo y seguridad alimentaria al contribuir con el aporte de proteína y lípidos para consumo de la población. Además favorece la disminución de la migración rural, la pobreza regional y contribuye a reducir la presión sobre los recursos naturales, particularmente en áreas costeras (FAO, 2005). La producción mundial de pesca y acuicultura suministró alrededor de 106 millones de toneladas de producto para consumo humano en 2004. De este total, la acuicultura representó el 43%, compensando con creces los efectos del crecimiento poblacional y del estancamiento que ha venido presentando la producción por pesca en el último decenio, básicamente a consecuencia de la sobre pesca o el estado de recuperación en el que se encuentran diversas pesquerías (FAO, 2006). Por el contrario, la acuicultura sigue creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal (FAO, 2006).

Entre los organismos de cultivo acuícola, el camarón representa un 16.5% del valor total de los productos pesqueros comercializados internacionalmente en 2004 (FAO, 2006). En el 2004 México ocupó el octavo lugar mundial como productor de camarón cultivado y el tercer lugar en Latinoamérica y el Caribe, después de Brasil y Ecuador (FAO, 2005). En México, el camarón representa más del 70% de peso vivo y más del 80% del valor de cultivo de toda la producción acuícola del país. El cultivo de camarón ha crecido desde 1988, cuando prácticamente no existía producción, hasta alcanzar 110,000 toneladas en el 2006, mientras que la pesca se ha mantenido estable durante el mismo periodo (Fig. 1) (Juárez, 2008). En nuestro país, las especies cultivadas corresponden principalmente al camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, camarón azul *L. stylirostris* y camarón café *Farfantepenaeus californiensis*. El camarón blanco es la especie más cultivada en el hemisferio occidental y su cultivo ha incrementado en el hemisferio oriental en los últimos años, dado que su desarrollo larvario no presenta grandes complicaciones y durante la engorda tolera amplios rangos de temperatura y salinidad, además de presentar la tasa más elevada de crecimiento en comparación con otras especies de camarón (Martínez-Córdova *et al.*, 1999).

Aún si el cultivo de estos crustáceos ha incrementado notablemente, existe una variedad de problemas que limitan mayores niveles de producción (Rodríguez *et al.*, 2003), particularmente salud, nutrición y calidad e inocuidad de los productos derivados de la acuicultura (FAO, 2004). Así, los mayores desastres de esta industria a nivel mundial se han dado por epizootias virales como Síndrome del Taura, Síndrome de la Mancha Blanca, IHNNV y NHP) y otros tipos de enfermedades (Martínez-Córdova, 2002). Las enfermedades son detectadas por lo general en etapas avanzadas en los sistemas de cultivo, cuando ya es evidente un crecimiento reducido en camarones, por comportamiento anormal o incluso cuando se presenta una amplia mortalidad de organismos (Perazzolo *et al.*, 2002).

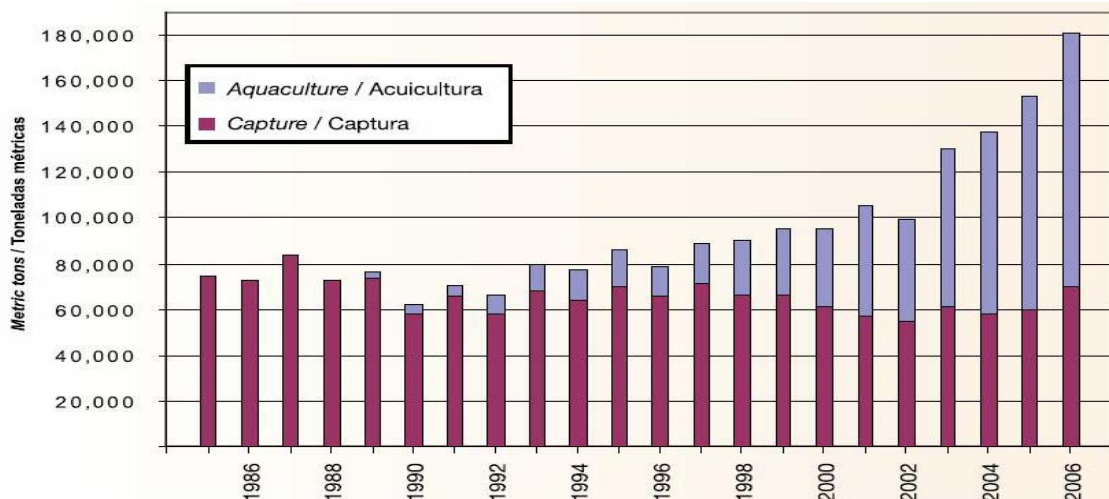


Fig. 1. Producción de camarón en México por captura y acuicultura; 1985 a 2006 (Juárez, 2008. Fuentes: CONAPESCA, FAO, Comités de Sanidad Acuicola).

En este sentido, es necesario establecer parámetros fisiológicos, inmunológicos (Bachère, 2000; Perazzolo *et al.*, 2002) y moleculares (De la Vega *et al.*, 2006) que funcionen como indicadores tempranos del estado de salud del camarón, permitiendo una valoración rápida y precisa para garantizar el éxito de los programas de cultivo. Por ejemplo, la camaronicultura ha tendido a ser cada vez más intensiva, realizándose a altas densidades de cultivo, donde los organismos están expuestos a cambios ambientales, que en conjunto con las prácticas de manipulación propias de la acuicultura, alteran su condición de homeostasis, representando un estado de estrés en los camarones (Lee y Wickins, 1992). Esta condición de estrés afecta el desempeño metabólico y capacidad inmune, incrementando la susceptibilidad del organismo a agentes patógenos (Le Moullac y Haffner, 2000; Perazzolo *et al.*, 2002; Joseph y Philip, 2007).

Algunos ejemplos de posibles indicadores tempranos son la síntesis de una familia de proteínas altamente conservadas, denominadas proteínas de shock térmico (Heat Shock Proteins, HSP por sus siglas en inglés) que son expresadas durante cambios bruscos de temperatura (Cimino *et al.*, 2002; Kregel, 2002; De la Vega *et al.*, 2006), pero también por hipoxia (Brouwer *et al.*, 2005) y presencia de agentes infecciosos (De la Vega *et al.*, 2006). Otro ejemplo es la expresión de enzimas antioxidantes cuya función es eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que permanecen en el organismo después de actuar como bactericidas durante el proceso de fagocitosis (Campa-Córdova *et al.*, 2005), tal como la superóxido dismutasa (SOD). Así, los cambios en la expresión de dichas proteínas pueden ser indicadores tempranos de que el organismo ha iniciado la movilización de metabolitos en respuesta a un estímulo, antes de presentarse manifestaciones fenotípicas (Brouwer *et al.*, 2005), por lo que la expresión de proteínas como HSP y SOD, en conjunto con el monitoreo de cambios a nivel fisiológico e inmunológico, podrían permitir pronosticar el estado de salud del organismo en respuesta a un determinado factor de estrés.

II. ANTECEDENTES

2.1 Ubicación taxonómica

Como miembros de los crustáceos, los camarones son artrópodos mandibulados con apéndices birrameados articulados, con dos pares de antenas, caparazón, branquias y se caracterizan por presentar un estadio de larva naupliar. La taxonomía del camarón blanco según Pérez-Farfante y Kensley (1997) es la siguiente:

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Crustacea
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Suborden	Dendrobranquiata
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>L. vannamei</i>

2.2 Características de la especie

El camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931, es una especie nativa de la costa oeste del Océano Pacífico, con una distribución geográfica desde Sonora, en el Golfo de California, hasta Perú en Sudamérica. Se encuentra en forma silvestre en aguas costeras de 0 hasta 72 m de profundidad sobre fondos fangosos. En su estado adulto, tienen preferencias por aguas marinas, donde copulan y desovan. Los huevos fertilizados se van al fondo y eclosionan. Las larvas planctónicas permanecen en aguas oceánicas alrededor de 3 semanas, durante este tiempo se desarrollan pasando generalmente por cinco fases de nauplio, tres fases del estadio de zoea y tres fases de estadio de mysis. Para continuar su desarrollo, las postlarvas ingresan a los sistemas estuarinos donde los camarones juveniles de aproximadamente 0.6 cm en adelante, adquieren hábitos bentónicos. Estos permanecen cerca o dentro de los sistemas estuarinos hasta alcanzar una talla entre 4 y 10 cm. Posteriormente, salen al océano en donde completan su madurez para comenzar de nuevo el ciclo. El camarón blanco puede alcanzar una talla comercial de unos 20 g en un tiempo de 4 a 6 meses a partir de postlarva, dependiendo las condiciones de cultivo. Se desarrolla bien en un amplio rango de salinidades e incluso se ha llegado a cultivar experimentalmente en agua dulce (Scarpa y Vaughan, 1998). Tolerancia amplia de rangos de temperatura que van de 20 a 30°C, aunque su crecimiento óptimo ocurre a temperaturas entre 25 y 30°C (Martínez-Córdova, 1999). En general los crustáceos son considerados poiquilotermos, por que su temperatura corporal fluctúa con la del medio

ambiente. Por tal motivo, los mecanismos de regulación térmica en crustáceos se basan en su comportamiento (desplazamiento en busca de lugares con temperaturas más convenientes) y en su capacidad de aclimatación térmica (Lagerspetz y Vainio, 2006). La regulación térmica por comportamiento, es generalmente el mecanismo más importante en camarones durante las fluctuaciones de la temperatura ambiental corto plazo, como es el ciclo diurno (Hochachka y Somero, 1984).

2.3 Estrés de Organismos Acuáticos en Cultivo

El concepto de estrés se ha definido como la condición en la cual se altera la homeostasis o el equilibrio dinámico de los organismos, en respuesta a estímulos internos o externos, denominados estresores (Pickering, 1981). El estrés puede influir todos los niveles de organización, desde acciones bioquímicas en el organismo, hasta a nivel de poblaciones (Barton e Iwama, 1991). De esta forma, el estrés promueve un conjunto de respuestas adaptativas que permiten restablecer el equilibrio y fortalecer la habilidad de las especies a sobrevivir (Newman, 2000). Sin embargo, en condiciones crónicas, el estrés pierde su valor adaptativo, afectando al organismo tanto a nivel inmunológico, como a nivel de crecimiento y reproducción (Ross y Ross, 1999; Newman, 2000). Como consecuencia es más apropiada la definición de estrés como una alteración de la estabilidad fisiológica del organismo, inducida por cambios ambientales, que confiere al individuo una mayor vulnerabilidad ante cambios subsecuentes (Bayne, 1975). Dado que el estrés al que están sometidos los organismos en cultivo, es inherente a las propias prácticas de acuicultura, se han identificado diversos factores causantes, los cuales pueden ser intrínsecos de cada organismo, o pueden ser factores externos (Fig. 2).

Factores Internos

El genotipo de cada individuo determina la susceptibilidad al estrés por cambios ambientales (Koehn y Bayne, 1989) y por lo tanto la resistencia del organismo a enfermedades (Tang *et al.*, 2000). Otro factor interno que determina la susceptibilidad al estrés es el estadio o ciclo de vida, ya que determinadas etapas pueden resultar más vulnerables ante agentes externos. En relación a esto, se ha reportado que las etapas larvarias son más sensibles ante la presencia de contaminantes en el medio (DeLorenzo *et al.*, 2006) y a contraer enfermedades infecciosas (Muñoz *et al.*, 2003). Por otro lado, está ampliamente documentado que el ciclo de muda afecta numerosas funciones fisiológicas e inmunológicas en el camarón, dado que antes y durante la muda, el organismo es más sensible a factores ambientales (Mugnier *et al.*, 2008) y a infecciones por vibriosis (Le Moullac *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004a) entre otros agentes patógenos. Dado que el estadio de muda de los camarones es uno de los factores considerados en el presente trabajo, se describirá brevemente este proceso.

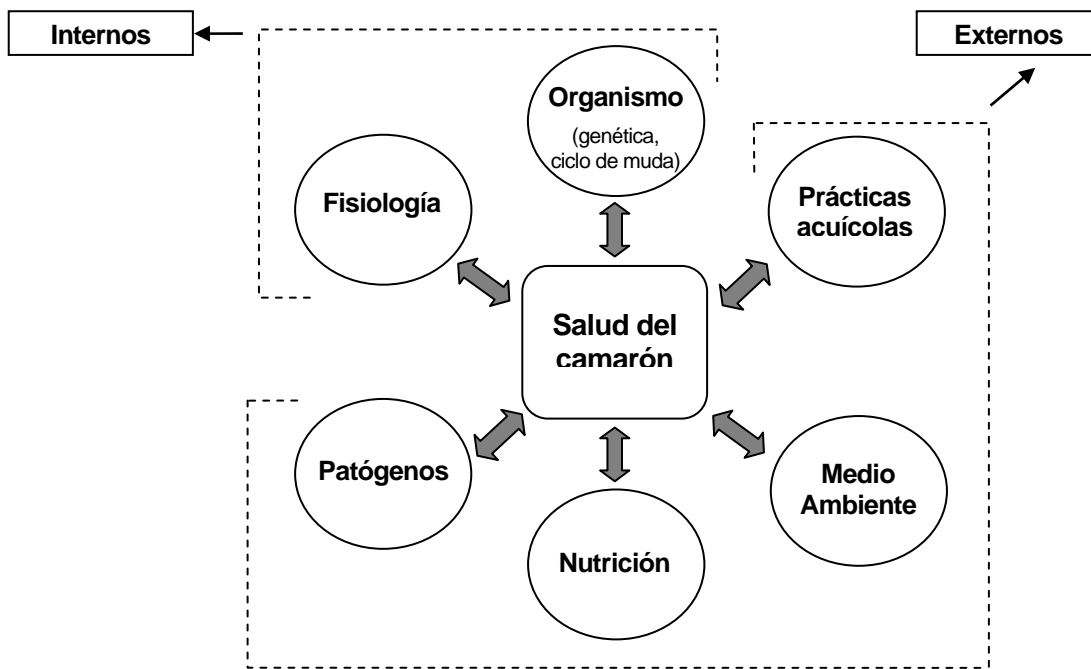


Fig. 2. Interacción de variables que afectan la salud en crustáceos (adaptado de Newman, 2000).

Ciclo de muda. El crecimiento en crustáceos está vinculado directamente con el proceso de muda, exuviación o ecdisis, lo cual implica el abandono del exoesqueleto, entrada de agua al organismo y síntesis de nuevos tejidos. Durante el ciclo de vida hay una sucesión de mudas, separadas por estadios de reposo o intermudas. Las mudas son más frecuentes en las primeras etapas de la vida del animal y disminuyen en los adultos (Petriella y Boschi, 1997; Whiteley y El Haj, 1997). Este conjunto de estadios están regulados por procesos hormonales cíclicos. La principal hormona involucrada es la hormona de la muda (HM), cuya síntesis se inicia en el órgano "Y". La síntesis de la HM es regulada por la hormona inhibidora de la muda (HIM) que se sintetiza en el órgano neurosecretor "X" y es almacenada y secretada en un órgano neurohemal llamado glándula del seno, también localizada en el pedúnculo ocular. La HIM promueve la formación de nuevos tejidos e inhibe la secreción de HM del órgano "Y". Cuando los niveles de HIM en hemolinfa disminuyen, el órgano "Y" secreta un ecdisteroide, precursor de la HM, caracterizado como ecdisona, que es transformado en otros tejidos a su forma activa, la 20-hidroxiecdisona, ecdisterona o crustecdisona. Es entonces cuando se desencadenan la serie de sucesos que conducen a la muda (Skinner *et al.*, 1985; Chang, 1991). En cada muda, cuando el viejo exoesqueleto es eliminado, tiene lugar un incremento de tamaño, como resultado de la absorción de agua que ocurre antes de que el nuevo tegumento se endurezca por incorporación de sales de calcio que se concentran en la hemolinfa (Petriella y Boschi, 1997).

De acuerdo a los criterios establecidos por Drach (1939) y Robertson (1987) se reconocen cinco estadios de muda principales con sus correspondientes subestadios:

- Estadio A, postmuda temprana: el animal acaba de abandonar la exuvia, continuando la secreción de la nueva cutícula.
- Estadio B, postmuda tardía: comienzan a endurecerse las diferentes capas de la nueva cutícula.
- Estadio C, intermuda: todo el exoesqueleto se engrosa y endurece. Hay crecimiento de tejidos y acumulación de reservas.
- Estadio D, premuda (D_0 - D_1 temprana y D_2 tardía): se reabsorben los minerales y materiales orgánicos del exoesqueleto y se deposita parcialmente el nuevo exoesqueleto, debajo del anterior.
- Estadio E, ecdisis: el individuo se desprende del viejo exoesqueleto.

Factores Externos

Además de las características intrínsecas de cada individuo, existe una gran variedad de factores externos que inducen estrés en organismos de cultivo. Ejemplo de esto son las condiciones ambientales, nutrición, exposición a patógenos, densidad de cultivo y la manipulación característica de las prácticas de cultivo como son la siembra, transferencia de organismos entre tanques, muestreos, rutinas de limpieza, etc. (Newman, 2000).

Los factores ambientales relacionados con la calidad de agua son una de las causas más comunes de estrés en organismos acuícolas. Se encuentra ampliamente documentado que fluctuaciones en la temperatura (Sánchez *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003), hipoxia (Pérez-Rostro *et al.*, 2004; Mugnier y Soyez, 2005; Mugnier *et al.*, 2008), amonio (Racotta y Hernández-Herrera, 2000; Mugnier *et al.*, 2008) y salinidad (Perazzolo *et al.*, 2002; Hurtado *et al.*, 2007) entre otras condiciones ambientales, pueden afectar el desempeño metabólico y/o inmunológico de organismos en cultivo. Dado que la temperatura es la condición central en el presente estudio, cabe resaltar su importancia como factor ambiental ya que interviene en todos los niveles de organización biológica, desde las interacciones moleculares, hasta los patrones de distribución biogeográfica de los organismos (Somero, 1997). Mientras la temperatura aumenta dentro de ciertos límites, la mayoría de los procesos metabólicos se aceleran, aumentando el consumo de oxígeno y consecuentemente se incrementa la producción de dióxido de carbono y otros productos excretorios como el amonio. El organismo se vuelve más activo y su ritmo de ingestión y digestión también aumentan (Schmidt-Nielsen, 1993; Poxton, 2003). Muchos procesos biológicos pueden llegar a duplicar su velocidad, por cada 10°C que aumenta la temperatura ($Q_{10} = 2$). Por ello los factores ambientales, y en particular las variables de calidad del agua, son más críticas conforme aumenta la temperatura (Boyd, 1990). La trascendencia de esta variable sobre los procesos fisiológicos se debe fundamentalmente al efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones bioquímicas, así como su influencia en estructuras y procesos dependientes de enlaces no

covalentes. Estos procesos establecen algunas de las propiedades más sensibles a la temperatura en los organismos, como es la habilidad de las membranas celulares de conservar su estructura física ante cambios térmicos (Somero,1997), la capacidad de las proteínas de mantener una conformación funcionalmente correcta, especialmente las enzimas involucradas en reacciones metabólicas (Randall *et al.*, 1997) y la habilidad de las proteínas reguladoras de genes para unirse efectivamente a los elementos reguladores de ADN (Somero,1997; Spees *et al.*, 2002a), entre otros procesos.

Como ejemplos de estresores relacionados con la manipulación de los organismos en etapas específicas del cultivo, se encuentran la ablación del tallo ocular para inducir la maduración de ovarios y desove en hembras, así como la extirpación del espermatóforo en machos, práctica común en camarones inseminados artificialmente. Estas prácticas alteran el balance hormonal y afectan numerosos aspectos de su fisiología incluyendo su sistema inmune (Perazzolo *et al.*, 2002). También se pueden considerar como estresores la toma de muestras de hemolinfa (Racotta y Palacios, 1998) o la captura de organismos (Mercier *et al.*, 2006) que son prácticas que pueden ocurrir durante un cultivo.

La nutrición es un factor que se encuentra estrechamente relacionado con la salud del organismo (Cuzon *et al.*, 2004). Se ha reportado que niveles bajos de proteína en la dieta de camarones pueden reducir el crecimiento, además de la capacidad inmune del organismo (Pascual *et al.* 2004). Diversos estudios sustentan que la presencia de ciertas vitaminas en la dieta, como la vitamina C (He y Lawrence, 1993) y la vitamina E (Liu *et al.*, 2007) confieren al organismo una mayor resistencia a condiciones de estrés, comparados con camarones cuya dieta es deficiente en estos nutrientes. También se ha encontrado que nutrientes como los ácidos grasos altamente insaturados (Rees *et al.*, 1994; Chim *et al.*, 2001; Palacios *et al.*, 2004), astaxantinas (Merchie *et al.*, 1998) y otros componentes de la dieta pueden mejorar la resistencia a determinadas condiciones de estrés.

Por lo general, los organismos en cultivo están sometidos a una compleja interacción de numerosos factores de estrés, afectando en forma acumulativa (Newman, 2000). Esto implica que mientras un factor de estrés por si solo, pareciera ser inofensivo, la presencia combinada de diversos factores dentro de un mismo lapso de tiempo, impide que el organismo tenga un periodo de recuperación, afectando consecuentemente la salud del individuo y de la población (Barton e Iwama, 1991).

2.4 Respuesta al estrés

Aunque la respuesta de los organismo frente a los agentes estresores es muy variable, se ha establecido la presencia de una respuesta generalizada de estrés (RGE). En vertebrados, esta respuesta está caracterizada por una fase inicial o de alarma ante el agente estresor, conocida como respuesta primaria u hormonal, seguida por un periodo de resistencia que comprende la respuesta secundaria o metabólica. Dependiendo de la magnitud y duración del estresor, seguirá una última fase de agotamiento (respuesta terciaria) en la cual la salud e incluso la vida del organismo se pueden ver fuertemente comprometidas, afectando procesos vitales como crecimiento, reproducción, capacidad de respuesta inmune y consecuentemente, la supervivencia (Pickering, 1981; Barton e Iwama, 1991; Ross y Ross, 1999).

Respuesta primaria

La respuesta primaria al estrés en vertebrados está mediada por el sistema nervioso, que a su vez activa al sistema endócrino, el cual promueve la liberación de hormonas al torrente sanguíneo. En peces y otros vertebrados, ésta respuesta es mediada principalmente por la activación de dos ejes neuroendócrinos: el sistema simpatoadrenal, que regula la liberación de catecolaminas y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, que modula la secreción de hormonas esteroidales. En peces que ha recibido algún estímulo estresor, las catecolaminas son liberadas directamente al torrente sanguíneo por el tejido cromafín localizado en la parte anterior del riñón, causando reacciones inmediatas, en cuestión de segundos u horas. Por el contrario, las hormonas esteroidales como el cortisol son liberadas a partir del tejido interrenal en la porción media del riñón y pueden causar efectos a largo plazo, desde horas hasta días (Ross y Ross, 1999). La liberación de éstas hormonas es influenciada por la naturaleza e intensidad del agente estresor, pero además puede ser influenciada por la edad y sexo de los animales, así como las condiciones ambientales (Wendelaar Bonga, 1997; Ross y Ross, 1999). Los crustáceos no poseen un eje neuroendócrino como el de vertebrados y las respuestas neuroendócrinas al estrés no están tan ampliamente estudiadas. No obstante, se ha sugerido la participación de la hormona hiperglucemiante (cHH) del tallo ocular (Keller *et al.*, 1992; Fingerman, 1997; Lorenzon *et al.*, 2000) durante la respuesta al estrés. Asimismo, se ha sugerido el papel de la serotonina como un posible modulador endógeno de estrés (Lüschen *et al.*, 1993) involucrado en la movilización de glucosa y producción de lactato en respuesta a manipulación experimental (Racotta y Palacios, 1998). Por otro lado, Fingerman (1994) reportó la presencia de catecolaminas (dopamina, octopamina y noradrenalina) con un papel neuromodulador. Se ha sugerido que la dopamina y noradrenalina también están involucradas en la osmorregulación de crustáceos (Zatta, 1987). Sin embargo, se han reportado efectos adversos de la dopamina, dado que aparentemente suprime el sistema inmune del organismo, haciéndolo más susceptible a infecciones (Li *et al.*, 2005).

Respuesta secundaria

Estas hormonas actúan a diferentes niveles de organización, provocando cambios metabólicos tales como aumento y movilización de sustratos energéticos, así como incremento en el consumo de oxígeno y transporte del mismo, lo que se conoce como respuesta secundaria. En general, estos cambios metabólicos tienen la finalidad de producir la energía necesaria para reestablecer la condición de equilibrio, alterada por la exposición a agentes estresores. En relación a esto, se han realizado numerosos trabajos donde se proponen diversos indicadores metabólicos de la respuesta secundaria al estrés. Algunos de estos estudios se señalan en la Tabla 1. Dentro de los indicadores clásicos de estrés en diferentes especies de crustáceos, se consideran variaciones en los niveles de glucosa (Hall y Van Ham 1998; Racotta y Palacios, 1998; Pascual *et al.*, 2003; Mercier *et al.*, 2006), lactato (Racotta y Palacios, 1998; Pascual *et al.*, 2003; Mugnier *et al.*, 2008) y capacidad osmorreguladora en hemolinfa (Charmantier y Soyez, 1994; Lignot *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2001; Mugnier *et al.*, 2008). Otras variables fisiológicas, como proteínas totales, hemocianina, lípidos totales, triglicéridos, carbohidratos totales y glucógeno, han sido analizadas en hemolinfa o en tejidos, con el fin de monitorear el estado de salud y el efecto del estrés en los camarones ante diversos estímulos (Pascual *et al.*, 2006, Racotta y Hernández-Herrera, 2000).

Además de la respuesta fisiológica, existe una respuesta celular al estrés que está caracterizada por la rápida síntesis de un grupo de proteínas llamadas proteínas de shock térmico (HSP). Estas proteínas son esenciales para la supervivencia tanto a temperaturas normales como elevadas (Feder y Hopffman, 1999; Kregel, 2002). Los mecanismos de activación y funcionamiento de estas proteínas, así como las diversas señales fisiológicas o factores de estrés que inducen su síntesis, serán mencionados más adelante.

Respuesta terciaria

Las consecuencias negativas del estrés sobre la susceptibilidad a enfermedades en vertebrados se deben principalmente a la influencia de cortisol y en menor grado de las catecolaminas sobre el sistema inmune (Wendelaar-Bonga, 1997). En crustáceos se ha reportado que diversos estímulos ambientales son determinantes en la reducción de la inmunocompetencia, haciendo a los organismos, más susceptibles a contraer enfermedades (Le Moullac y Haffner, 2000; Chim *et al.*, 2001; Perazzolo *et al.*, 2002) y eventualmente, afectando la supervivencia.

Tabla 1. Efecto de diversos estímulos de estrés sobre variables fisiológicas evaluadas en distintas especies de camarón.

Efecto sobre variables	Factor de estrés	Tiempo de exposición	Especie	Referencias
↑ glucosa hemolinfa	- Hipoxia, anoxia y acidosis	- agudo	<i>P. monodon</i>	- Hall y Ham, 1998
	- Muestreos repetitivos	- 30, 60 y 120min		- Racotta y Palacios, 1998
↓ glucosa hemolinfa	- Hipoxia	- agudo y crónico	<i>L. vannamei</i>	- Racotta <i>et al.</i> , 2002
	- Manipulación	- crónico: 4 semanas		- Mercier <i>et al.</i> , 2006
	- Infección con <i>V.alginolictus</i>	-12, 36, 48, 60 y 72 hrs		- Hsieh <i>et al.</i> , 2008
	- Aclimatación a 31°C por 7 días	- crónico: 7 días	<i>L. setiferus</i>	- Sanchez <i>et al.</i> , 2001
↑ glucógeno hep	- Hipertermia (33°C)	- crónico: 10 días		- Pascual <i>et al.</i> , 2003
	- Ayuno	- crónico: 7 a 21 días	<i>L. vannamei</i>	- Pascual <i>et al.</i> , 2006
	- Actividad reproductiva continua	- crónico	<i>L. schmitti</i>	- Pérez-Jar <i>et al.</i> , 2006
↓ carbohidratos hep	- Altas concentraciones de amonio	- 24 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Racotta y Hndz-Herrera, 2000
↓ carbohidrato _{musc}	- Ayuno prolongado	- crónico: 7 a 21 días		- Pascual <i>et al.</i> , 2006
↑ lactato hemolinfa	- Hipoxia aguda	- agudo: 1 hr	<i>L. vannamei</i>	- Pérez-Rostro <i>et al.</i> , 2004
	- Manipulación	- crónico: 4 semanas		- Mercier <i>et al.</i> , 2006
↓ lactato hemolinfa	- Manipulación	- crónico: 4 semanas	<i>L. vannamei</i>	- Mercier <i>et al.</i> , 2006
	- Inyección de serotonina	- 30, 60 y 120min	<i>L. vannamei</i>	- Racotta y Palacios, 1998
	- Hipoxia	- agudo y crónico		- Racotta <i>et al.</i> , 2002
↑ lactato hep y/o musc	- Infección con <i>V.alginolictus</i>	- de 12 a 72 hrs		- Hsieh <i>et al.</i> , 2008
	- Hipoxia+amonio	- 24 hrs	<i>L. stylirostris</i>	- Mugnier <i>et al.</i> , 2008
↓ lactato hep y/o musc	- Aclimatación a 27°C	- crónico: 7 días	<i>L. setiferus</i>	- Sánchez <i>et al.</i> , 2001
	- Hipertermia (33°C)	- crónico: 5 días		- Pascual <i>et al.</i> , 2003
↓ lactato musc	- Altas concentraciones de amonio	- 24 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Racotta y Hndz-Herrera, 2000
	- Hipoxia	- agudo: 1 hr		- Pérez-Rostro <i>et al.</i> , 2004
↓ proteínas hemolinfa	- Altas concentraciones de amonio	- 24 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Racotta y Hndz-Herrera, 2000
	- Ablación de tallo oc. y extirpación de esperm.	- 24 hrs	<i>P. japonicus</i>	- Chen <i>et al.</i> , 1994
	- Aclimatación (27°C)	- 7 días después	<i>F. paulensis</i>	- Perazzolo <i>et al.</i> , 2002
	- Hipertermia (33°C)	- crónico: 7 días	<i>L. setiferus</i>	- Sanchez <i>et al.</i> , 2001
	- Ayuno prolongado	- crónico: 5 días		- Pascual <i>et al.</i> , 2003
	- Manipulación	- crónico: 7 a 21 días	<i>L. vannamei</i>	- Pascual <i>et al.</i> , 2006
	- Amonio, hipoxia+amonio	- crónico: 4 semanas		- Mercier <i>et al.</i> , 2006
	- Actividad reproductiva continua	- 24 hrs	<i>L. stylirostris</i>	- Mugnier <i>et al.</i> , 2008
↑ proteína hep y/o musc	- Múltiples desoves	- crónico	<i>L. vannamei</i>	- Palacios <i>et al.</i> , 2000
	- Hipoxia a corto plazo	- agudo: 1 hr		- Perez-Rostro <i>et al.</i> , 2004
↓ hemocianina	- Hipoxia	- crónico 15 días	<i>L. vannamei</i>	- Racotta <i>et al.</i> , 2002
	- Altas concentraciones de amonio	- 24 hrs	<i>P. japonicus</i>	- Chen <i>et al.</i> , 1994
	- Ayuno prolongado	- 24 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Racotta y Hndz-Herrera, 2000
↑ triacilglicerol hemolinfa	- Manipulación	- crónico: 7 a 21 días		- Pascual <i>et al.</i> , 2006
	- Infección con <i>V.alginolictus</i>	- 12, 24 y 36 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Hsieh <i>et al.</i> , 2008
↓ triacilglicerol hemolinfa	- Aclimatación a 27 y 31°C	- crónico: 7 días	<i>L. setiferus</i>	- Sanchez <i>et al.</i> , 2001
	- Hipertermia (33°C)	- crónico: 5 días		- Pascual <i>et al.</i> , 2003
	- Manipulación	- crónico: 4 semanas	<i>L. vannamei</i>	- Mercier <i>et al.</i> , 2006
↓ acilglicerol hemolinfa	- Altas concentraciones de amonio	- 24 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Racotta y Hndz-Herrera, 2000
	- Ayuno prolongado	- crónico: 21 días		- Pascual <i>et al.</i> , 2006
↓ lípidos tot hep	- Ayuno prolongado	- crónico: 7 a 21 días	<i>L. vannamei</i>	- Pascual <i>et al.</i> , 2006
	- Manipulación	- crónico: 4 semanas		- Mercier <i>et al.</i> , 2006
↑ PO hemolinfa	- Hipo e hipersalinidad	- agudo y crónico	<i>L. vannamei</i>	- Hurtado <i>et al.</i> , 2007
	- Nitritos	- 24 hrs	<i>P. japonicus</i>	- Chen y Cheng, 1996
↑ CO hemolinfa	- Aclimatación a 27 y 31°C	- crónico: 7 días	<i>L. setiferus</i>	- Sánchez <i>et al.</i> , 2001
	- Hipoxia	- crónico: 2 a 4 días	<i>L. vannamei</i>	- Charmantier <i>et al.</i> , 1994
↓ CO hemolinfa	- Hipertermia (33°C)	- crónico: 5 días	<i>L. setiferus</i>	- Pascual <i>et al.</i> , 2003
	- Ciclo de muda: B, D ₀ -D ₂	- crónico	<i>L. stylirostris</i>	- Lignot <i>et al.</i> , 1999
	- Hipoxia, amonio, hipoxia+amonio	- 24 hrs		- Mugnier <i>et al.</i> , 2008

Hep: hepatopáncreas, musc: músculo, PO: presión osmótica, CO: capacidad osmorreguladora, tallo oc: tallo ocular, esperm: espermatóforo.
 ↑ Incrementa o ↓ disminuye significativamente respecto a su control experimental.

2.5 Proteínas de Shock Térmico (HSP)

Las HSP son proteínas presentes en células procariotas y eucariotas. Su alto nivel de conservación sugiere que presentan un papel importante en los procesos celulares fundamentales (Feder y Hofmann, 1999). Estas proteínas fueron inicialmente descubiertas en larvas de *Drosophila melanogaster* expuestas a "shock térmico", por lo que fueron denominadas de la misma forma (Ritossa, 1962). Las principales HSP tienen una masa molecular que va desde los 15 a los 110-kDa, y están divididas en grupos en base a su tamaño y función. Están presentes en el citosol, mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo, aunque esta ubicación varía dependiendo de la proteína en particular (Kregel, 2002). La familia de las HSP70 son las más conservadas, incluyendo su presencia en vertebrados, además de ser las más sensibles a los cambios en la temperatura (Lindquist, 1986). Cabe mencionar que la nomenclatura comúnmente empleada para nombrar al conjunto de proteínas de estrés que forman las familias, es utilizando letras mayúsculas: HSP70 y para denominar a alguna proteína en específico dentro de una familia, se utilizan letras minúsculas: Hsp70, Hsp72, etc. (Kregel, 2002). Las proteínas de esta familia comparten secuencias de amino ácidos, pero son sintetizadas en respuesta a diferentes estímulos. En dicha familia, existen por lo menos cuatro proteínas distintas: Hsp72, Hsp73, Hsp75 y Hsp78. La proteína de 73-kDa (Hsc70: heat shock cognate o constitutive) se produce constantemente, por lo que recibe el nombre de constitutiva, mientras que la de 72-kDa (Hsp70), es altamente inducible y su síntesis se incrementa en respuesta a múltiples estresores (Kiang y Tsokos, 1998).

El gen de Hsp70 está constituido por 2,440 pares de bases (Wu *et al.*, 1986). Presenta por lo menos dos elementos reguladores en la región 5' que interactúan con los factores de transcripción (HSF). Los HSF se encuentran en el citosol unidos a las HSP, manteniéndose de esta forma en un estado inactivo. Una amplia variedad de estresores o señales fisiológicas pueden activar los HSF, provocando que se separen de las HSP. Una vez separados, los HSF son fosforilados por proteincinasas, formando trímeros en el citosol. Los complejos de HSF-trímeros entran al núcleo y se unen a los elementos de shock térmico (HSE) en la región del promotor del gen Hsp70. Es entonces cuando el ARN mensajero de Hsp70 es transcrito y sale del núcleo para dirigirse al citosol, donde una nueva proteína Hsp70 será sintetizada (Fig. 3) (Kregel, 2002). El mensaje de las Hsp70 es preferentemente traducido por las células bajo estrés, excluyendo otros mensajes e inhabilitando temporalmente a la célula a producir otras proteínas o a responder a señales adicionales. En base a éste modelo, es relevante considerar la acumulación de Hsp70 en diferentes tejidos, ya que puede ser utilizada como un biomarcador de daño celular (Hall *et al.*, 2000).

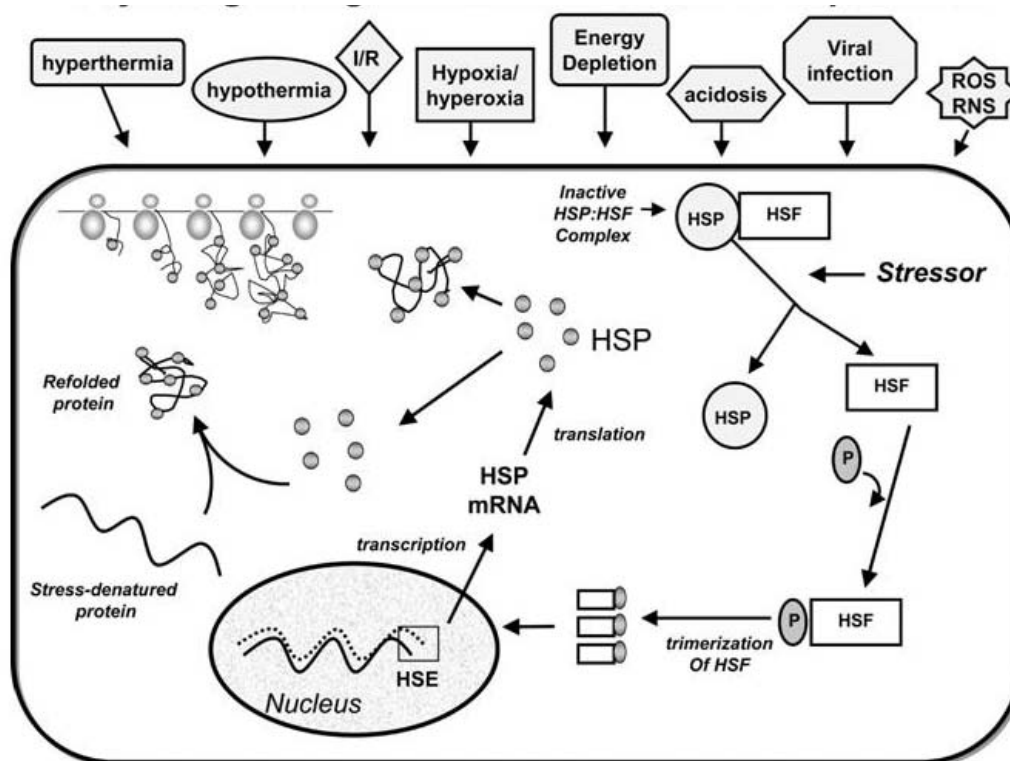


Fig. 3. Mecanismo de activación de Hsp70 por las principales señales fisiológicas o estresores que inducen su síntesis. Los factores de transcripción (HSF) inactivos, unidos a las HSP en el citosol, se activan con diversos estresores, provocando que se separen de las HSP. Los HSF son fosforilados (P) por proteincinasas, formando trímeros en el citosol, los cuales entran al núcleo y se unen a los elementos de shock térmico (HSE) en la región del promotor del gen Hsp70, iniciando la transcripción del mRNA de Hsp70 que se dirigirá al citosol, donde una nueva Hsp70 será sintetizada (Kregel, 2002).

Una de las principales funciones fisiológicas asociadas con la acumulación de Hsp70 inducida por estrés es la termotolerancia adquirida, la cual es definida como la habilidad de la célula o del organismo a volverse resistente al estrés por hipertermia, después de haber estado previamente expuesto a condiciones subletales de temperaturas elevadas (Mizzen y Welch, 1988). En este sentido, se ha postulado que la familia de las HSP70 está involucrada en prevenir la desnaturalización y/o procesar las proteínas desnaturalizadas o fragmentos de éstas, producidos por estresores como la hipertermia. Se han atribuido a las HSPs y en particular a la familia de las HSP70, diversas funciones citoprotectoras como:

- Plegamiento de proteínas en diversos compartimentos celulares
- Mantenimiento de proteínas estructurales
- Plegamiento de proteínas desnaturalizadas
- Traslocación de proteínas a través de las membranas a varios compartimentos celulares
- Prevención de agregación de proteínas
- Degradación de proteínas inestables

De esta forma la función primaria de las HSP70 durante el estrés celular es mantener la traducción y la integridad de las proteínas (Kregel, 2002). Sin embargo se ha observado que animales de edad más avanzada son menos termotolerantes a una primera exposición a altas temperaturas, que etapas juveniles de las mismas especies (Hall *et al.*, 2000). También se ha demostrado que la inducción de Hsp70 esta asociada con el desarrollo de tolerancia a varios tipos de estrés, incluyendo hipoxia, acidosis, disminución de energía y radiación ultravioleta, entre otros (Kregel, 2002). Además de estas funciones generales, se ha reconocido en algunos mamíferos, que las HSPs actúan como señales moduladoras para la respuesta inmune e inflamatoria (Moseley, 2000). Por su parte, se conoce que las Hsp70 facilitan la presentación de antígenos en células como macrófagos y dendritas (Todryk *et al.*, 1999).

Existen diversos trabajos en crustáceos, donde se documentan las variaciones de expresión en la proteína inducible Hsp70 (Tabla 2) e incluso se ha encontrado que la expresión de la proteína constitutiva Hsc70 también puede modificarse, dependiendo de la naturaleza e intensidad del estímulo, así como del tejido donde sea analizada dicha proteína (Liu *et al.* 2004b; Lo *et al.*, 2004) (Tabla 2). Entre los estímulos comúnmente estudiados como activadores de la síntesis de Hsp70, se encuentran principalmente los cambios de temperatura (Downs, 2001; Liu *et al.* 2004b; Lo *et al.*, 2004; Selvakumar y Geraldine, 2005; De la Vega *et al.*, 2006), además de estrés por salinidad (De la Vega *et al.*, 2006), hipoxia (De la Vega *et al.*, 2006), exposición a contaminantes (Downs, 2001), entre otros factores ambientales. También se han reportado variaciones en los niveles de expresión de Hsp70 a lo largo del ciclo de muda en camarón blanco (Renato y Yang, 2007). Por otro lado, se ha sugerido que la inducción de Hsp70 como resultado de shock térmico, pudiera estar involucrada con la inhibición en la replicación de ciertos virus en crustáceos (De la Vega *et al.*, 2006).

Los estudios sobre la participación de las HSP70 en la respuesta al estrés en crustáceos son aún limitados y existe escasa información sobre los mecanismos de tolerancia a diversos estresores y su relación con el desempeño metabólico e inmunológico bajo condiciones adversas.

Tabla 2. Efecto de diversos estímulos de estrés sobre la expresión de Hsp70 o Hsc70 en distintas especies de camarón.

Efecto sobre la expresión	Factor de estrés	Tiempo de exposición	Tejido analizado	Especie	Referencias
↑ Hsp70 ^Δ	Hipertermia de 22 a 38°C (en 70 min)	8 hrs	organismo completo	<i>P. pugio</i>	Downs <i>et al.</i> , 2001
= Hsp70 ^Δ	Hipertermia de 22 a 30°C (en 70 min)	8 hrs	organismo completo		
= Hsc70 ^Δ	Hipertermia de 26 a 37°C	1 hr	hemocitos	<i>P. monodon</i>	Lo <i>et al.</i> , 2004
↑ Hsc70 ^Δ	Hipertermia de 26 a 37°C	1 hr + 1hr de recup.	hemocitos		
= Hsc70 ^Δ	Hipertermia de 26 a 37°C	1 hr + 2 a 6 hrs de recup.	hemocitos		
= Hsc70 ^Δ	Hipertermia de 25 a 30°C	2 hrs	músculo	<i>M. rosenbergii</i>	Liu <i>et al.</i> 2004a
↑ Hsc70 ^Δ	Hipertermia de 25 a 35°C	2 hrs	músculo		
↑ Hsp70 ^Δ	Hipertermia de 25 a 35°C	2 hrs	Músculo, gang. tor., hep, ovário, branq., int.		
↑ Hsp70 ^Δ	Hipertermia a 30 y 36°C (acl. 20°C)	3 hrs + 1 hr de recup.	Branq y corazón	<i>M. malcolmsonii</i>	Selvakumar y Geraldine, 2005
	Hipertermia a 34 y 38°C (acl. 30°C)				
= Hsp70 ^Δ	Hipertermia a 37°C (acl. 20°C) Hipertermia a 39 y 40°C (acl. 30°C)	3 hrs + 1 hr de recup.	Branq y corazón		
↑ Hsp70 ^Δ	Hipertermia de 29 a 35°C (2°C/hr)	24 hrs (2 ^a exp.)	músculo	<i>P. monodon</i>	De la Vega, 2006
= Hsp70 ^Δ	Hiposalinidad de 53 a 10 ‰ (en 45 min)	8 hrs (2 ^a exp.)	músculo		
= Hsp70 ^Δ	Hipoxia 1 ppm	8 hrs (2 ^a exp.)	músculo		
↑ Hsp70 ^Δ	Exposición a cloruro de cadmio	8 hrs	organismo completo	<i>P. pugio</i>	Downs <i>et al.</i> , 2001
↑ Hsp70 ^Δ	Exposición a combustible diesel	48 hrs	organismo completo		

Acl: aclimatación, recup: recuperación, gang. tor.: ganglio torácico, hep: hepatopáncreas, branq: branquias. ↑ Incrementa o = no incrementa significativamente respecto a su control experimental.

2.6 Sistema Inmune de Crustáceos

El sistema inmune incluye un conjunto de mecanismos que permiten el reconocimiento de lo propio y lo extraño, con el objetivo de proteger la integridad biológica del individuo. Los crustáceos han desarrollado a lo largo de su evolución una línea de defensa no específica, que carece de capacidad de memoria y ha sido clasificada como sistema inmune innato (Bayne, 2003). En la respuesta inmune de los crustáceos se distinguen efectores celulares y humorales, que actúan en conjunto para proteger al hospedero una vez que el invasor a sobrepasado la barrera fisicoquímica de la cutícula.

Las reacciones celulares incluyen fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación de microorganismos o parásitos invasivos, así como su destrucción por moléculas citotóxicas y microbicidas (Söderhäll y Cerenius, 1992; Roch, 1999). Por otro lado, las reacciones humorales comprenden distintas moléculas solubles, tales como lectinas del plasma (Marques y Barracco; 2000), especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Homblad y Söderhäll, 1999), componentes del sistema profenol-oxidasa (Söderhäll *et al.*, 1996), péptidos antimicrobianos (Destoumieux *et al.*, 1997) proteínas involucradas en la coagulación de hemolinfa (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000) y moléculas asociadas al reconocimiento de agentes extraños (Vargas-Albores y Yepiz-Plasencia, 2000).

Respuesta celular

Los hemocitos en los invertebrados son los efectores primarios de la inmunidad celular no específica. El número de hemocitos circulantes puede variar en respuesta a infecciones, factores ambientales o a la actividad endócrina durante el ciclo de muda, de forma que nuevos hemocitos requieren producirse y liberarse de los tejidos hematopoyéticos. En los crustáceos, el principal tejido hematopoyético está situado en la porción dorsal y dorso-lateral del estómago, alrededor de la arteria antenal y en la base de los maxilípedos (Johansson *et al.*, 2000). Se han caracterizado tres tipos de hemocitos en base a criterios morfológicos y funcionales: los hialinos, semigranulares y granulares.

- Los hemocitos hialinos son lo más pequeños, se identifican por la ausencia de gránulos, además de que presentan un núcleo amplio y céntrico (Martin y Graves, 1985). Se ha propuesto que las células hialinas están asociadas a procesos de fagocitosis (Johansson, 2000) y coagulación (Montaño-Pérez *et al.*, 1999).
- Los hemocitos semigranulares son de tamaño ligeramente mayor que los hialinos, además de presentar numerosos gránulos pequeños (Martin y Graves, 1985). Se sugiere que este tipo celular está involucrado en la encapsulación, fagocitosis y citotoxicidad, así como en el almacenamiento y liberación del sistema profenoloxidasa (proPO) (Johansson, 2000).
- Los hemocitos granulares presentan un núcleo pequeño en forma de riñón y cuentan con gran cantidad de gránulos de mayor tamaño que el tipo celular anterior (Martin y Graves, 1985). Su principal función consiste en el almacenamiento y liberación del sistema proPO, contenido principalmente en los gránulos (Johansson, 2000). Los granulocitos también almacenan las peneidinas, que son péptidos antimicóticos y antimicrobianos que actúan principalmente contra bacterias Gram positivas (Destoumieux *et al.*, 1997).

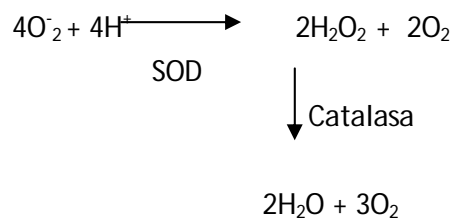
La fagocitosis es uno de los mecanismos de defensa celular más común y consiste en la ingestión o englobamiento de partículas biogénicas por parte de una célula (Söderhäll y Cerenius, 1992). Posteriormente, las células fagocíticas destruyen a los organismos mediante dos mecanismos de defensa; el anaerobio, que es atribuido a la acción de diversas enzimas

microbicidas, como lisozimas y péptidos antimicrobianos; y el mecanismo aerobio, que está ligado al estallido respiratorio (Nappi y Ottaviani, 2000).

Acoplado al proceso de fagocitosis aerobia, se generan sustancias microbicidas que incluyen intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), como el anión superóxido (O_2^-), que se genera a partir de la reducción de una molécula de oxígeno por la NADH oxidasa. También hay generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (Muñoz *et al.*, 2000) e intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) como óxido nítrico y peroxinitrito (Roch, 1999). Las ROI y las RNI se generan dentro de las vacuolas fagocíticas, pero estas moléculas son capaces de cruzar al ambiente extracelular y causar un daño potencial a las células del hospedero (Warner, 1994). Elevadas concentraciones de ROI han sido asociadas al daño de ADN, carbohidratos y proteínas, promoviendo el desarrollo de enfermedades degenerativas (Bendich, 1993).

No obstante, los organismos cuentan con defensas antioxidantes, incluyendo mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Las defensas enzimáticas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa, catalasa y peroxidasas, las cuales eliminan eficientemente el peróxido de hidrógeno de las células (Smith, 1994; Campa-Córdova *et al.*, 2005).

La superóxido dismutasa es una metaloproteína que puede presentarse como un dímero, trímero o tetrámero. Requiere un grupo metal para catalizar la conversión del radical libre superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, que serán transformados posteriormente por la catalasa en agua y oxígeno, compuestos inocuos para la célula (Tovar-Ramírez, 1998; Gómez-Anduro *et al.*, 2006).



Actualmente se conocen seis tipos de esta enzima: cobre-zinc SOD, níquel SOD, manganeso-hierro SOD, hierro SOD y manganeso SOD (MnSOD). La MnSOD es una proteína codificada en el genoma del núcleo celular, cuya función antioxidante se conocía originalmente en mitocondria. Sin embargo se ha propuesto que en crustáceos, la MnSOD citosólica (cMnSOD) sustituye a la CuZnSOD para evitar la competencia con el cobre, que es central para ligar el oxígeno en la hemocianina (Brouwer *et al.*, 1997; Gómez-Anduro *et al.*, 2006). En general, la secuencia de aminoácidos de la MnSOD de animales, plantas o bacterias se mantiene muy conservada, al igual que su sitio catalítico. Esta proteína es codificada por al menos tres genes y su expresión, además de ser tejido-específica (Gómez-Anduro *et al.*, 2006), es modulada por agentes físicos, químicos y biológicos. En relación con la respuesta al estrés, se ha reportado una disminución en la actividad de esta enzima en hemocitos y plasma del bivalvo *C. gallina* al ser sometido a condiciones de anoxia (Monari *et al.*, 2005).

La encapsulación es otro mecanismo de defensa celular que tiene lugar cuando un parásito es demasiado grande para ser fagocitado. En este caso, varios hemocitos lo encapsulan, retirando de la circulación a la partícula extraña. Asimismo, la formación de nódulos se lleva a cabo cuando la cantidad de microorganismos invasores es tan grande que no pueden ser removidos por fagocitosis. El resultado de este proceso conlleva atrapar a los microorganismos en varias capas de hemocitos, con la posterior activación del sistema profenol oxidasa y la consecuente melanización de los microorganismos. La melanización consiste en una serie de reacciones bioquímicas desencadenadas por las defensas celulares en invertebrados, dando como producto final el polímero melanina. Éste polímero participa en el endurecimiento de la exocutícula con el fin de aislar microorganismos de mayor tamaño o reparar heridas (Söderhäll y Cerenius, 1992).

Respuesta humoral

En crustáceos la melanización está regulada por la cascada de reacciones enzimáticas conocida como el sistema profenoloxidasas. Este sistema puede ser activado en forma natural por componentes microbianos, como lo son los β -glucanos de hongos, los peptidoglicanos y los lipopolisacáridos bacterianos (Vargas-Albores, 1995). Durante su activación, la proPO es convertida en fenoloxidasas (PO), por acción de una proteinasa llamada enzima activadora de la profenoloxidasas. Esta última se encuentra en forma inactiva en el interior de los gránulos de los hemocitos y se activa después de su liberación, en presencia de calcio plasmático. La PO promueve la oxidación de fenoles a quinonas, que se polimerizan de manera no enzimática formando depósitos insolubles de melanina, que pueden ser observados como manchas oscuras en el caparazón de los camarones. La melanina también está implicada en los procesos de esclerotización y reparación de daños de la cutícula (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

Dentro de los mecanismos de defensa humoral, se encuentra el sistema de coagulación de la hemolinfa. Este previene la pérdida de hemolinfa debido a heridas en el exoesqueleto y la diseminación de bacterias en todo el cuerpo. La proteína involucrada en la coagulación de camarones peneidos es denominada proteína coaguladora (CP) y se encuentra en el plasma. La polimerización de la CP se lleva a cabo mediante la acción de la enzima transglutaminasa (TGasa) en presencia de calcio. La TGasa en crustáceos se encuentra en el interior de las células hialinas y es liberada al plasma por daño tisular o como respuesta de los hemocitos ante la presencia de lipopolisacáridos y β -glucanos (Montaño-Pérez *et al.*, 1999, Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000).

Aunque los invertebrados no presentan inmunoglobulinas, dentro de la respuesta humoral se encuentran componentes de reconocimiento que son parte del sistema de defensa. En crustáceos se encuentran tres tipos de proteínas de reconocimiento que se unen a la pared celular de diferentes microorganismos:

- LPS-BP (lipopolysaccharide binding protein): proteína de unión a los lipopolisacáridos de pared celular en bacterias Gram negativas.

- BGBP (β -glucan binding protein): proteína de unión a los β -glucanos en hongos.
- Finalmente las proteínas de unión a los peptidoglucanos, en pared celular de bacterias Gram positivas.

Estas proteínas activan la defensa celular, después de una reaccionar con su ligando (Sritunyalucksana y Söderhäll, 2000). Se ha documentado que el complejo BGBP- β -1,3 glucano (BGBP-L) se puede unir al hemocito e inducir su de granulación parcial (Barraco *et al.*, 1991).

Las lectinas son glucoproteínas que reconocen carbohidratos. Estas proteínas son consideradas moléculas de reconocimiento primitivas debido a su habilidad para aglutinar células y a sus propiedades de opsonización, es decir, a la capacidad de unirse al agente patógeno, facilitando así la fagocitosis. Algunos estudios han demostrado la habilidad de las lectinas de invertebrados para aglutinar e inmovilizar patógenos y parásitos, lo que permite una posterior eliminación de estos organismos ya sea por fagocitosis o bien, por encapsulación (Marques y Barracco, 2000). Se ha visto que algunas lectinas promueven la activación del sistema proPO (Ratcliffe *et al.*, 1991).

Los péptidos antimicrobianos son otro componente humoral que se encuentra ampliamente distribuido en los seres vivos y son considerados elementos clave de la inmunidad innata. En el camarón *L. vannamei* se han caracterizado tres péptidos antimicrobianos denominados peneidinas, los cuales fueron aislados de los gránulos del citoplasma en hemocitos granulares y semigranulares. La actividad de estas peneidinas esta principalmente dirigida contra bacterias Gram positivas y hongos (Destoumieux *et al.*, 1997). Se sugiere que estos péptidos son liberados al plasma como resultado de la degranulación de los hemocitos (Bachère *et al.*, 2000).

Se han realizado numerosos estudios sobre las alteraciones en los componentes celulares y humorales del sistema inmune ante diversas condiciones de estrés (Tabla 3). Dentro de las variables inmunológicas comúnmente evaluadas, se encuentra el conteo total de hemocitos, el cual varía al exponer a organismos a condiciones de hipoxia (Le Moullac *et al.*, 1998), altas concentraciones de amonio (Mugnier *et al.*, 2008), cambios de temperatura (Wang y Chen, 2006), salinidad (Perazzolo *et al.*, 2002) y presencia de metales pesados, entre otros contaminantes ambientales (Le Moullac y Haffner, 2000). Además, se ha considerado el conteo diferencial de hemocitos, actividad fagocítica y procesos acoplados a ésta, como es la producción de especies reactivas de oxígeno, entre ellas el anión superóxido y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Liu y Chen 2004; Wang y Chen 2006; Hsieh *et al.*, 2008). Asimismo, se ha analizado la actividad de la profenoloxidasa y fenoloxidasa (Perazzolo *et al.*, 2002; Pérez-Jar *et al.*, 2006), la actividad de péptidos antibacterianos (Rodríguez y Le Moullac, 2000) y el tiempo de coagulación (Jussila *et al.*, 2001) con el fin de monitorear la capacidad inmune en camarones penidos. Por otro lado, se ha iniciado el estudio a nivel molecular de la expresión de genes relacionados al sistema de defensa en crustáceos, con el fin de comprender los mecanismos regulatorios de la respuesta inmune (Zhang *et al.*, 2007, Gómez

-Anduro *et al.*, 2007) y como posibles indicadores de selección para mejorar la resistencia a infecciones (Bachère, 2003).

La definición de indicadores de estrés en crustáceos es por sí misma una línea relevante de investigación, dado que permitirían detectar una situación adversa en el cultivo antes de que afecte el crecimiento, la supervivencia y la vulnerabilidad ante enfermedades.

Tabla 3. Efecto de diversos estímulos de estrés sobre las variables inmunes evaluadas en distintas especies de camarón.

Efecto - variables	Factor de estrés	Tiempo de exposición	Especie	Referencias
↓ Tiempo de coagulación	- Ejercicio por persecución	- 1hr post estrés	<i>P. cygnus</i>	- Jussila <i>et al.</i> , 2001
↑ Actividad fenoloxidasas	-Actividad reproductiva continua	- crónico	<i>L. schmitti</i>	- Pérez-Jar <i>et al.</i> , 2006
↓ Actividad fenoloxidasas	- Ciclo de muda: D ₁ – D ₂	- puntual	<i>L. stylirostris</i>	- Le Moullac <i>et al.</i> , 1997
	- Extirpación del espermatóforo	-7 días post estrés	<i>F. paulensis</i>	- Perazzolo <i>et al.</i> , 2002
	- Exposición a amonio	- crónico : 168 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Liu y Chen, 2004
	- Hipertermia de 32°C	- de 24 a 96 hrs		- Cheng <i>et al.</i> , 2005
	- Infección con <i>V.alginolictus</i>	- de 24 a 72 hrs	<i>P. monodon</i>	- Hsieh <i>et al.</i> , 2008
	- Cambios de temp. de 26 a 22, 30 y 34°C	- de 24 a 96 hrs.		- Wang y Chen, 2006
↑ Anión superóxido	- Exposición a amonio	- crónico: 48 y 168 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Liu y Chen, 2004
↓ Anión superóxido	- Cambios de temp. de 26 a 22, 30 y 34°C	- 24 hrs post estrés	<i>P. monodon</i>	- Wang y Chen, 2006
	- Infección con <i>V.alginolictus</i>	- de 24 a 72 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Hsieh <i>et al.</i> , 2008
↑ SOD	- Hipertermia de 38°C	- 8 hrs	<i>P. pugio</i>	- Downs <i>et al.</i> 2001
	- Exposición a combustible	- 48 hrs		
↓ Actividad SOD	- Exposición a amonio	- crónica : 168 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Liu y Chen, 2004
	- Infección con <i>V.alginolictus</i>	- de 12 a 72 hrs		- Hsieh <i>et al.</i> , 2008
	- Cambios de temp. de 26 a 22, 30 y 34°C	- 24 hrs post estrés	<i>P. monodon</i>	- Wang y Chen, 2006
↑ expresión de SOD hemocitos	- Infección por WSSV	- 1 hr post estrés	<i>L. vannamei</i>	- Gómez-Anduro <i>et al.</i> , 2006
	- Infección por WSSV	- 6 y 12 hrs post estrés	<i>F. chinensis</i>	- Zhang <i>et al.</i> , 2007
↓ expresión de SOD hemocitos	- Infección por WSSV	- 12 hrs post estrés	<i>L. vannamei</i>	- Gómez-Anduro <i>et al.</i> , 2006
	- Infección por WSSV	- 24 y 48 hrs post estrés		- Zhang <i>et al.</i> , 2007
↓ Actividad fagocítica	- Exposición a amonio	- crónico: 168 hrs	<i>L. vannamei</i>	- Liu y Chen, 2004
	- Cambios de temp. de 26 a 22, 30 y 34°C	- 24 hrs post estrés	<i>P. monodon</i>	- Wang y Chen, 2006
↑ CTH	- Ciclo de muda: B, D ₀ – D ₂	- puntual	<i>L. stylirostris</i>	- Le Moullac <i>et al.</i> , 1997
	- Ejercicio por persecución	- 1 hr post estrés	<i>P. cygnus</i>	- Jussila <i>et al.</i> , 2001
↓ CTH	-Ablación de tallo oc. y extirpación del sperm.	-7 días post estrés	<i>F. paulensis</i>	- Perazzolo <i>et al.</i> , 2002
	- Hipertermia de 32°C	- de 24 a 96 hrs.	<i>L. vannamei</i>	- Cheng <i>et al.</i> , 2005
	- Ayuno	- crónico: 7 a 21 días	<i>L. stylirostris</i>	- Pascual <i>et al.</i> , 2006
	- Infección con <i>V.alginolictus</i>	- 12 y 24 hrs	<i>P. monodon</i>	- Hsieh <i>et al.</i> , 2008
	- Hipoxia, hipoxia+amonio en D ₂	- 24 hrs		- Mugnier <i>et al.</i> , 2008
	- Cambios de temp. de 26 a 22 y 34°C	- de 24 a 96 hrs.	<i>L. schmitti</i>	- Wang y Chen, 2006
	- Actividad reproductiva continua	- crónico		- Pérez-Jar <i>et al.</i> , 2006
↓ hemocitos granulares	- Ciclo de muda: B, D ₀ – D ₂	- puntual	<i>L. stylirostris</i>	- Le Moullac <i>et al.</i> , 1997
↓ CDH	- Cambios de temp. de 26 a 22 y 34°C	- de 24 a 96 hrs	<i>P. monodon</i>	- Wang y Chen, 2006

SOD: superóxido dismutasa, CTH: conteo total de hemocitos, CDH: conteo diferencial de hemocitos. Tallo oc: tallo ocular, sperm: espermatóforo. ↑ incrementa o ↓ disminuye significativamente respecto a su control experimental.

III. JUSTIFICACIÓN

La incidencia de enfermedades en el cultivo de camarón en México representa una de las principales limitantes para la intensificación del cultivo, debido a que éstas se manifiestan generalmente en etapas muy avanzadas, cuando el óptimo crecimiento y supervivencia de los organismos ya ha sido comprometido. Se reconoce que el estrés juega un papel crucial en la susceptibilidad de los organismos a las enfermedades. El conocer la variación de parámetros moleculares, fisiológicas e inmunes en respuesta a diversas condiciones de estrés, como es la hipertermia, pueden funcionar como indicadores tempranos del estado de salud del organismo. Lo cual permitirá proporcionar al acuicultor una herramienta para detectar oportunamente el estado de estrés en los camarones y de esa forma, desarrollar medidas correctivas o incluso preventivas antes de que el daño en los cultivos sea irreversible.

IV. HIPÓTESIS

El shock térmico de 28 a 32°C o 35°C en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, activará la expresión de Hsp70 y MnSOD, además de aumentar la demanda energética del organismo. Lo cual se traducirá en una disminución de reservas energéticas circulantes y tisulares de lípidos, carbohidratos y proteínas. Por otro lado, se esperan alteraciones en indicadores típicos de estrés como en los niveles circulantes y tisulares de lactato como indicador de una activación del metabolismo anaerobio, así como una disminución en la capacidad osmorreguladora. Finalmente, el estrés por hipertermia afectará negativamente la capacidad de respuesta inmune al disminuir el conteo total de hemocitos y el sistema oxidante-antioxidante (O_2^- , SOD) del organismo.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la influencia de estrés a corto plazo por hipertermia e identificar bioindicadores a nivel molecular, fisiológico e inmunológico en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos particulares

- Evaluar la respuesta fisiológica por hipertermia de 28 a 32°C y 35°C, a corto plazo.
- Determinar efecto de hipertermia a corto plazo sobre la capacidad de respuesta inmune en camarón blanco a partir del tiempo de coagulación, el conteo total de hemocitos y los niveles del sistema oxidante-antioxidante (O_2^- , SOD).
- Detectar la variación en los niveles de expresión de los genes de Hsp70 y MnSOD por efecto de hipertermia a corto plazo.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Organismos y condiciones experimentales

6.1.1 Mantenimiento y aclimatación de organismos

El presente trabajo se realizó en su totalidad en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), unidad La Paz, Baja California Sur. Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* de 10 a 25 gramos, a partir del excedente de organismos del Programa de Mejoramiento Genético (Ana Ma. Ibarra Humphries). Los camarones fueron capturados de los estanques supralitorales y transferidos para su mantenimiento hasta el experimento al área húmeda del Laboratorio de Genética Acuícola y otra parte al laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos. Las unidades de mantenimiento consistieron en tanques de plástico de 100 y de 2500 Lts, según el experimento, los cuales fueron llenados con agua marina a dos terceras partes de su capacidad total, con una densidad de cultivo de 10 a 20 organismos por m². El agua de las unidades se mantuvo bajo las siguientes condiciones: foto periodo natural, salinidad de 37 ± 2 ups, temperatura regulada de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, con un recambio de agua del 80% diario y aireación constante. Se administró alimento comercial peletizado con 35% de proteína (PIASA o VIMIFOS) dos veces al día a saciedad aparente. Es decir, que se ajustó la porción de alimento de tal manera que la cantidad de pellet que dejaran los camarones sin ingerir, fuera mínima, resultando en una razón total del 3 a 5% de la biomasa. El alimento no consumido y las heces fueron removidos diariamente. Los organismos permanecieron en mantenimiento por un periodo de al menos 20 días para ser trasladados posteriormente a los dispositivos experimentales.

Los dispositivos experimentales para las pruebas de estrés (Fig. 4), consistieron en tinas de plástico de 35 Lts. con tapa, a las cuales se transfirieron dos camarones por réplica el día anterior con el fin de tener un periodo de aclimatación de 17 a 20 horas. Durante este lapso de tiempo, los camarones permanecieron en ayuno y bajo las mismas condiciones de foto periodo, salinidad, aireación y temperatura, mencionadas anteriormente.

6.1.2 Condiciones de estrés por hipertermia

Una vez transcurrido el periodo de aclimatación, los organismos fueron sometidos a condiciones de hipertermia en tres bioensayos separados. Se utilizaron calentadores sumergibles para incrementar la temperatura, en el primer bioensayo: de 28 a 32°C a una tasa de incremento de 1°C cada 15 minutos. Para el segundo bioensayo, de 28 a 35°C en una hora (equivalente a 1.2°C cada 10 minutos). Y en el tercer bioensayo se incrementaron las dos temperaturas antes descritas. Una vez alcanzado el límite superior de temperatura para cada caso, los camarones fueron mantenidos a esa máxima temperatura por 2 horas más. Se estableció la temperatura de 35°C como máxima, ya que a partir de la exposición por 2 horas a 37°C, se empezó a

presentar mortalidad de los organismos. Transcurridas las 3 horas desde que se inició el experimento, se realizó el muestreo (Fig. 4).

6.2 Diseño experimental

6.2.1 Primer bioensayo: incremento de temperatura de 28 a 32°C

En este experimento se utilizaron tres diferentes grupos: El primer grupo fue denominado Control Absoluto (CA), el cual consistió en 14 réplicas o individuos muestreados al momento del bioensayo directamente del grupo de organismos que permanecían en condiciones de ayuno dentro de las unidades de mantenimiento y por lo tanto, no habían estado en contacto con el dispositivo experimental. Este grupo se utilizó con el fin de descartar un posible efecto de estrés causado por transferencia de los organismos a los dispositivos experimentales y la manipulación de los calentadores durante la prueba. También se utilizó un grupo Control (C), formado por 33 organismos o réplicas, transfiriendo dos individuos en cada dispositivo experimental donde permanecieron durante el mismo tiempo que el grupo de estrés, pero a una temperatura constante de 28°C, sin ser sometidos a hipertermia. El grupo experimental o sometido a estrés por hipertermia (ST 32°C) consistió en 31 individuos, colocados a razón de dos organismos en cada dispositivo experimental. Posteriormente se incrementó la temperatura de 28 hasta 32°C, tal como se describió en la sección anterior.

6.2.2 Segundo bioensayo: incremento de temperatura de 28 a 35°C

Debido a los resultados obtenidos en el experimento anterior (ver Anexo III), en este bioensayo sólo se utilizaron dos grupos: el Control (n=60) y el grupo de Shock Térmico (ST 35°C, n= 64). Ambos grupos estuvieron sometidos a las mismas condiciones mencionadas en el primer bioensayo, con la única diferencia, que la temperatura en el grupo de Shock térmico, llegó a incrementarse hasta 35°C.

6.2.3. Tercer bioensayo: Respuesta de la expresión génica por incremento de temperatura de 28 a 32°C y de 28 a 35°C

En este bioensayo se utilizaron tres grupos: el Control (n=6) y los dos grupos de estrés; ST 32°C (n=5) y ST 35°C (n=7). Estos grupos estuvieron sometidos a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. En este experimento, a diferencia de los anteriores, sólo se consideraron para los muestreos organismos en fase de intermuda.

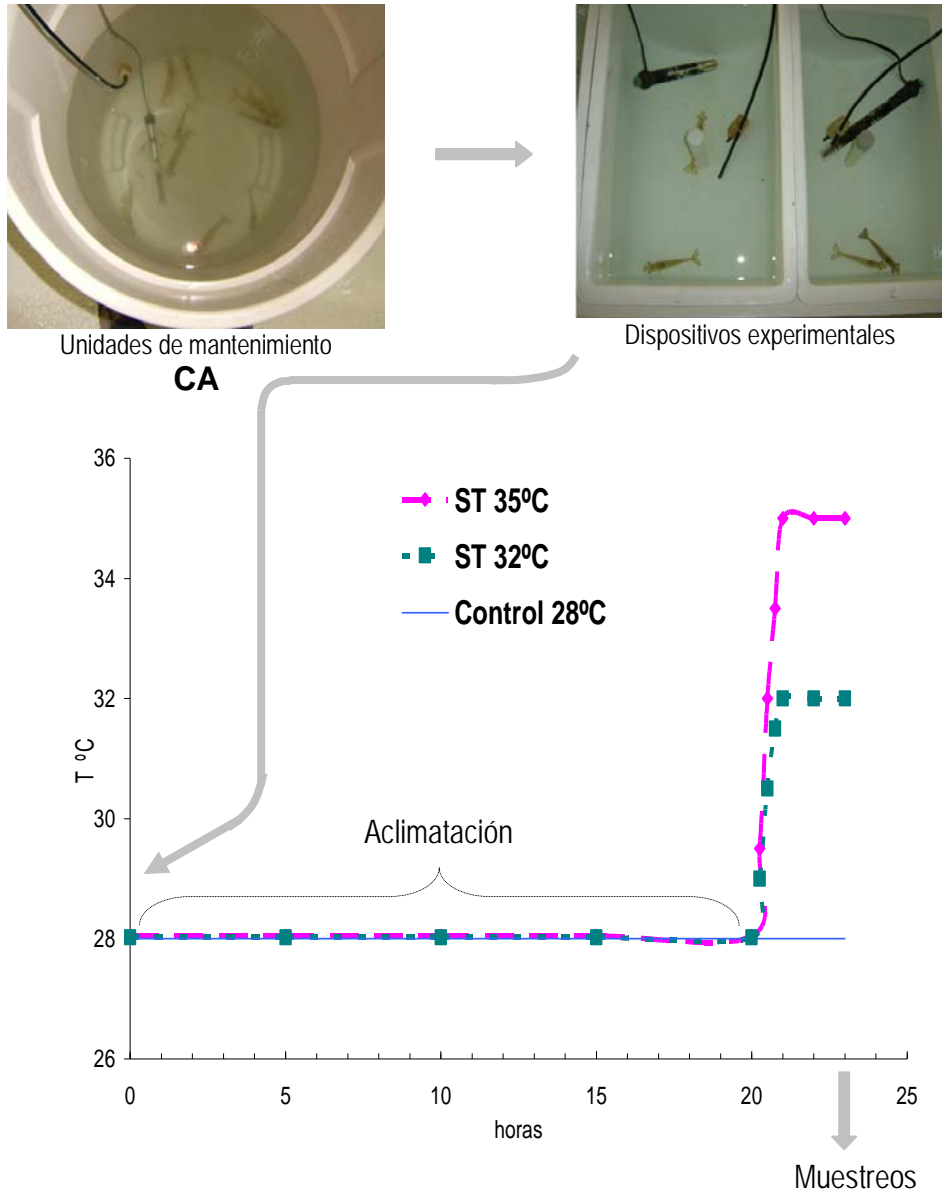


Fig. 4. Secuencia del diseño experimental. Los organismos son trasladados de las unidades de mantenimiento, a los dispositivos experimentales para ser aclimatados por 20 hrs. Enseguida inicia el incremento de temperatura en un lapso de 1 hora para los grupos de estrés (ST: shock térmico a 32 y 35 °C), permaneciendo a la temperatura máxima durante 2 hrs más. El control permanece el mismo tiempo a una temperatura constante de 28°C. Después de 3 horas desde que inicio el incremento de temperatura (a la hora 23), se procede al muestreo. En el caso del grupo de Control Absoluto (CA), los organismos permanecieron en las unidades de mantenimiento, es decir no fueron sometidos a este protocolo.

6.2.4 Parámetros fisicoquímicos del agua

Se realizaron tres registros de temperatura y oxígeno del agua en cada unidad experimental durante las pruebas de estrés térmico. La medición de temperatura se realizó con un termómetro de mercurio. La concentración de oxígeno disuelto (mg L^{-1} y % de saturación) se obtuvo con un oxímetro de campo (modelo YSI 50B). Durante el bioensayo 1 (28 - 32°C), el

primer registro se realizó al momento de iniciar la prueba (t 0'). El segundo registro se tomó al minuto 60 (t 60'), es decir, cuando el grupo sometido a estrés alcanza la máxima temperatura. La última lectura se realizó al terminar la prueba, en el minuto 180 (t 180'), al momento del muestreo. Para la prueba de 28-35°C, únicamente se tomaron registros al t 0' y t 180'.

6.3 Muestreo de los organismos

Trascurridas las 3 horas de exposición a las diferentes temperaturas evaluadas en cada experimento, se procedió al muestreo de los camarones. En todos los muestreos se registró el peso de cada individuo usando una balanza digital (sensibilidad: 0.01 gr). También se colectó un urópodo para la posterior determinación del estadio de muda a través de la observación del crecimiento de las setas bajo el microscopio óptico (Robertson *et al.*, 1987). Posteriormente, se colectó el cefalotórax junto con el primer segmento abdominal, se sumergieron en nitrógeno líquido y subsecuentemente a -70°C. Todos los organismos muestreados recibieron este procesamiento general, además un procedimiento en particular para la obtención de muestras de hemolinfa, mismo que se realizó de acuerdo a las distintas variables a analizar (ver secciones 6.3.1 a 6.3.4). Los muestreos se llevaron a cabo entre las 12:00 y las 3:00 p.m., repitiendo el experimento a lo largo de varios días y utilizando lotes de 12 a 18 camarones por día, denominados submuestreos. Es necesario señalar que los submuestreos se realizaron con camarones diferentes para los distintos tipos de variables a analizar de acuerdo a la Tabla 4. Asimismo, el número de organismos utilizados en cada grupo varía de acuerdo al tipo de análisis (Tabla 4).

6.3.1 Variables fisiológicas

Para la determinación de metabolitos, se extrajo hemolinfa (~300 µl) a partir de seno hemolinfático ventral, utilizando una jeringa de 1 ml con aguja removible, previamente enjuagada en solución fría de oxalato de potasio al 5% como anticoagulante disuelto en solución isotónica de crustáceos (SIC: 450 mM NaCl, 10 mM KCl, Vargas Albores *et al.*, 1993). La hemolinfa obtenida se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó (a 800 *g*, por 3 min. a 4°C) para separar el plasma del paquete celular, que fue almacenado a -20°C, para posteriores análisis. Para la determinación de presión osmótica en hemolinfa, se utilizaron organismos diferentes provenientes de otro sub-muestreo, donde se punzó con una aguja la parte dorsal de la membrana torácico-abdominal del camarón y se extrajeron inmediatamente 10 µl de hemolinfa con una micropipeta para ser analizados al momento, utilizando un osmómetro de presión de vapor como se describe abajo. El número de ejemplares muestreados para el análisis de variables fisiológicas se especifica en la Tabla 4.

6.3.2 Actividad de superóxido dismutasa

Para la determinación de la actividad SOD, el material y soluciones que tenía contacto directo con la hemolinfa fueron previamente esterilizados. Se extrajo hemolinfa (~500 µl) a partir de seno hemolinfático ventral, utilizando una jeringa de 3 ml, que contenía previamente 1 ml de anticoagulante EDTA frío (10 mM de EDTA Na₂ disuelto en SIC mas 10 mM HEPES, pH 7.3, Vargas Albores *et al.*, 1993). La hemolinfa se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó (a 700 g, por 15 min. a 4°C). El plasma se separó y almacenó a -20°C, para su posterior análisis. El paquete celular fue resuspendido en 300 µl de buffer fosfatos (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.8) y transferido a tubos de vidrio para ser homogenizados por baño de sonicación, durante 10 minutos (sonicador Branson, modelo 2510). Finalmente, se centrifugaron las muestras (a 12000 g por 15 min. a 4°C), se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para ser analizados posteriormente. El procesamiento que recibieron los hemocitos antes de ser almacenados, fue establecido de acuerdo a los resultados obtenidos en pruebas preliminares (Anexo I). El número de ejemplares muestreados para el análisis de esta variable se especifica en la Tabla 4.

6.3.3 Variables inmunes

El tiempo de coagulación (TC) fue analizado en los mismos organismos muestreados para la presión osmótica. De igual manera, la hemolinfa fue extraída de la parte dorsal de la membrana torácico-abdominal del camarón, en este caso con ayuda de un capilar, para ser procesada de inmediato, usando el método de Jussila *et al.* (2001) como se describe abajo. Los muestreos para las otras variables inmunes, se realizaron bajo las mismas condiciones de esterilidad que en el caso de actividad SOD pero en distintos organismos obtenidos en un sub-muestreo diferente. Una vez extraída la hemolinfa (~500 µl + 1 ml de anticoagulante EDTA) del seno hemolinfático ventral, se colocaron 100 µl en un tubo de vidrio con 400 µl de solución fijadora (formaldehído puro al 4% en anticoagulante) para realizar enseguida el conteo total de hemocitos (CTH). El resto de la hemolinfa fue colocada en tubos Eppendorf y mantenida a 4°C para analizar al momento la producción de anión superóxido. El número de individuos muestreados para el análisis de variables inmunes, se señala en la Tabla 4.

6.3.4 Obtención de mARN

Para la obtención de ARN mensajero (mARN) se realizaron muestreos distintos que para el resto de las variables. Se manejaron las mismas condiciones de esterilidad y se extrajo la hemolinfa de la misma manera que en los muestreos de actividad SOD. Las muestras de hemolinfa (~500 µl + 1 ml de anticoagulante EDTA disuelto en agua DEPC: dietil pirocarbonato al 0.1%) fueron centrifugadas enseguida (a 700 g por 15 min. a 4°C). Se desechó el sobrenadante y los hemocitos fueron resuspendidos en TRIzol® (Invitrogen) para ser procesados al momento. El segundo par de pleópodos fue disectado con tijeras estériles

e inmersos en ARN later (Ambion, diluido 1:4 en agua DEPC) para inhibir la degradación del mRNA. El ARN obtenido a partir de los hemocitos, pleópodos y hepatopáncreas fue utilizado para detectar la presencia de transcritos de Hsp70 y MnSOD. En este muestreo sólo se consideraron los organismos en estadio de intermuda. El número de camarones muestreados para esta variable, se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Número de organismos muestreados para la determinación de las distintas variables.

Primer bioensayo	CA	Control	ST 32°C	ST 35°C
SM1: Variables fisiológicas en hemolinfa	8	18	17	
SM2: Tiempo de coagulación - Presión osmótica	6	13 ^a -15	12 ^a -14	
Segundo bioensayo				
SM1: Variables fisiológicas en hemolinfa y tejidos		16		18
SM2: Tiempo de coagulación - Presión osmótica		16		17 - 15 ^a
SM3: Actividad SOD		16		18
SM4: Cuenta Total Hemocitos y Anión superóxido		12		13
Tercer bioensayo				
Extracción de mRNA		6	5	7

CA: Control absoluto, ST: Shock térmico. SM1 a 4: Submuestras de distintos organismos para las diferentes variables analizadas.
^aEn algunos casos no fue posible la toma de muestra para el total de los organismos del submuestreo.

6.4 Métodos analíticos

6.4.1 Variables fisiológicas en hemolinfa

La determinación de proteínas totales y hemocianina en hemolinfa fue realizada inmediatamente después del muestreo. Posteriormente, las muestras del plasma remanente fueron descongeladas para la cuantificación de glucosa, lactato y triglicéridos. Todas estas variables, con excepción de la hemocianina, fueron analizadas con técnicas adaptadas a microplaca, mismas que fueron leídas en un fotocolorímetro Bio-Rad, modelo 680, para determinar su absorbancia. Para la determinación de estas variables, se realizó una regresión lineal de la curva tipo, utilizando la pendiente para calcular la concentración de las muestras.

Proteínas Totales. Esta variable fue determinada de acuerdo al método de Bradford (1976) adaptado a microplaca (Sigma-Aldrich, 2006). Este método se basa en la reacción de los grupos amino libres con el azul de Comassie en presencia de ácido fosfórico y etanol produciendo un compuesto colorido cuya absorbancia puede ser leída a 595 nm.

Las muestras de plasma fueron diluidas 1:100 en solución isotónica de crustáceos (SIC). A partir de esta dilución, se colocaron 10 µl de cada muestra en un pozo de la microplaca y se le agregaron 200 µl de reactivo para Bradford (Sigma), mismas que se

dejaron reaccionar por 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm. Como estándar se utilizó una curva tipo de albúmina sérica bovina (ABS, Sigma), con las siguientes concentraciones: 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mg ml⁻¹, utilizando SIC como diluyente y blanco.

Hemocianina. Para la cuantificación de hemocianina, se diluyeron las muestras de plasma a razón de 1:20 en SIC. Posteriormente, las muestras se colocaron en celdas de 1 ml para determinar su absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro (UNICO, modelo UV-2100). La concentración se calculó de acuerdo al coeficiente de extinción (E^{1%}) equivalente a 2.83 (Hagerman, 1986):

$$\text{Concentración de Hemocianina}_{\text{mg/ml}} = (\text{Abs}_{340\text{nm}} \times \text{factor de dilución} \times 10) / E^{1\%}$$

Donde:

- Factor de dilución= 20
- E^{1%}= 2.83
- El factor 10 se utilizó para poder expresar la concentración en mg ml⁻¹

Glucosa. La concentración de glucosa se determinó de acuerdo al método enzimático descrito en el kit comercial (GOD-PAP, Randox), que consiste en la oxidación enzimática de la glucosa, liberando peróxido de hidrógeno. Este reacciona con fenol y 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa, formando un cromógeno rojo-violeta, cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Para la determinación de esta variable, se colocaron 20 µl de plasma sin diluir en un pozo de la microplaca. Posteriormente, se agregaron 200 µl de la solución reactiva, dejándolos incubar por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 490 nm. La curva tipo se elaboró a partir de solución estándar (glucosa 100 mg dl⁻¹) con las siguientes concentraciones: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 mg dl⁻¹, utilizando SIC como blanco.

Lactato. Esta variable fue determinada de acuerdo al método enzimático descrito en el kit comercial (PAP, Randox), que consiste en la oxidación enzimática del lactato a piruvato, con la consecuente formación de peróxido de hidrógeno. Este último es oxidado por una peroxidasa, formando un cromógeno de color violeta, que es directamente proporcional a la concentración de lactato contenido en la muestra.

Para determinar esta variable, se realizaron diluciones de la hemolinfa en proporción 1:4 con SIC. Se colocaron 20 µl de estas diluciones con 200 µl de la solución reactiva y se dejaron reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se determinó la absorbancia de las muestras a 540 nm. Se realizó una curva tipo a

partir de una solución estándar de 40 mg dl⁻¹, utilizando las siguientes concentraciones: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg dl⁻¹ y SIC como blanco.

Triglicéridos. Para el análisis de esta variable, se utilizó el kit comercial (GOD-PAP, Randox), con el cual los triglicéridos son determinados a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoneimina formada por peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, bajo la influencia catalítica de la peroxidasa, cuya coloración es proporcional a la concentración del glicerol-fosfato.

Se utilizaron 20 µl de las muestras de plasma sin diluir, se le agregaron 200 µl de la solución reactiva y se dejaron reaccionar por 20 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 490 nm. La curva tipo se hizo a partir de la solución estándar incluida en el kit y cuya concentración es de 200 mg dl⁻¹, utilizando las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg dl⁻¹ y SIC como blanco.

Presión osmótica. Esta variable se determinó mediante un osmómetro de presión de vapor (VAPRO, modelo 5520), el cual proporciona una medida indirecta de la osmolaridad, ya que se fundamenta en los cambios de energía libre de un solvente al estar en contacto con solutos, modificándose las propiedades coligativas, como los son la presión de vapor, el punto de congelación y el punto de ebullición.

La presión de vapor se determinó en una muestra de 10 µl que se colocó inmediatamente en el osmómetro de presión de vapor, obteniendo valores en términos de concentración total de solutos (mmol kg⁻¹). La calibración del osmómetro se realizó con estándares comerciales de 100, 290 y 1000 mmol kg⁻¹.

6.4.2 Variables fisiológicas en tejidos

A partir de las muestras de cefalotórax almacenadas a -70°C, se extrajeron los hepatopáncreas completos, de los cuales se obtuvieron aproximadamente 100 mg. Adicionalmente, se obtuvieron aproximadamente 200 mg de músculo del primer segmento abdominal. Ambos tejidos fueron disectados sobre una placa fría, se registró el peso de las muestras para cada organismo y se liofilizaron por un lapso de 24 horas. Al cabo de este tiempo, todas las muestras fueron pesadas nuevamente para calcular su porcentaje de humedad. Posteriormente, se pulverizaron e hidrataron con 500 µl de SIC en el caso de hepatopáncreas y 1.5 ml de SIC para músculo. Finalmente, los extractos fueron homogenizados y separados en varias alícuotas para los análisis bioquímicos. Se determinó la concentración de proteínas totales, glucógeno y lactato en ambos tejidos. Adicionalmente, en el caso de hepatopáncreas se determinaron las concentraciones de lípidos totales y triglicéridos. En todos los casos, se expresaron los valores en mg g⁻¹ de peso seco del tejido. Para el análisis de lípidos totales, triglicéridos y lactato, se utilizó el

mismo el mismo lector de microplacas mencionado anteriormente. En el caso de proteínas totales y glucógeno se empleó el espectrofotómetro (UNICO, modelo UV-2100).

Proteínas totales. Esta variable fue determinada de acuerdo al método de Bradford (1976). Se utilizaron 10 µl del extracto de ambos tejidos, y se les agregó hidróxido de sodio (NaOH 0.5 N), 300 µl en el caso del músculo y 100 µl para hepatopáncreas, mismos que se dejaron digerir durante 2 horas. Posteriormente, se tomaron 10 µl de la muestra digerida y se les agregó 1 ml de reactivo de Bradford, dejándolas reaccionar por 5 minutos para determinar su absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Se utilizó una curva tipo con las mismas concentraciones que en los análisis de hemolinfa.

Lactato. Los niveles de lactato en tejidos fueron determinados de acuerdo al mismo método enzimático (PAP, Randox) mencionado anteriormente. Se tomaron 200 µl del extracto de ambos tejidos, se les agregó 200 µl de ácido tricloroacético al 20% (TCA) para desproteinizar cada muestra y se centrifugaron (a 2300 *g* por 15 min. a 4°C). Se recuperó el sobrenadante y se tomaron 20 µl en el caso de músculo y 30 µl para hepatopáncreas. Posteriormente se agregaron 200 µl de la solución reactiva y al cabo de 10 minutos se determinó su absorbancia a 540 nm. Se utilizaron las mismas concentraciones de la curva tipo que en los análisis de hemolinfa, empleando TCA, como diluyente y blanco.

Glucógeno. Esta variable se determinó por el método de antrona, el cual consiste en coprecipitar el glucógeno con algún electrolito en presencia de etanol (Van Handel, 1965). El glucógeno purificado es hidrolizado a unidades de glucosa por hidrólisis ácida a alta temperatura y la glucosa así obtenida reacciona con antrona, produciendo un derivado del furano de coloración azul verdosa, que tiene su absorbancia máxima a 620 nm (Roe, 1954).

Para cuantificar el glucógeno en los tejidos, se recuperaron 100 µl del mismo sobrenadante empleado para la determinación de lactato (200 µl del extracto de tejido + 200 µl de TCA al 20%). Se le añadieron 2 ml de etanol frío, mas 50 µl de sulfato de sodio anhidro al 20% para favorecer la precipitación del glicógeno. Posteriormente, se centrifugaron las muestras (a 2300 *g* por 10 min. a 4°C), se decantó la mayor parte del etanol y el etanol residual se evaporó en un horno a 70°C. Una vez secas las muestras, se resuspendieron en 100 µl de agua destilada y se agregó 1 ml de solución de antrona al 1% en ácido sulfúrico (H₂SO₄ al 80%). A continuación se colocaron en un baño de agua caliente a 80°C por 6 minutos. Transcurrido el tiempo se sumergieron en agua con hielo por 2 minutos más para detener la reacción. Finalmente, se determinó la absorbancia de las muestras a 630 nm. Como estándar se utilizó una curva tipo de glucógeno (10 mg ml⁻¹), con las siguientes concentraciones: 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mg ml⁻¹, utilizando TCA como diluyente y blanco. La curva tipo recibió el mismo tratamiento que las muestras, a partir de la precipitación con etanol.

Lípidos totales. Los índices de lípidos totales en hepatopáncreas fueron determinados en base al método de sulfofosvainillina (Barnes y Blackstock, 1973), en el cual los lípidos no saturados, en presencia de ácido y calor, forman iones carbonio que al estar en contacto con la fosfovainillina dan una coloración rosada cuya intensidad es proporcional a la concentración de lípidos totales en la muestra.

Se utilizaron 25 µl de extracto de hepatopáncreas diluido en proporción 1:4 en SIC, a los cuales se les agregó 250 µl de H₂SO₄ concentrado. Las muestras se agitaron y calentaron a 90°C en baño de agua por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, fueron sumergidas en baño de agua con hielo para detener la reacción. Posteriormente se colocaron 20 µl de las muestras en un pozo de microplaca y se le agregaron 200 µl de vainillina (marca EM). Se dejó incubar la reacción por 40 minutos a temperatura ambiente y finalmente se leyó su absorbancia a 540 nm. Para la curva tipo se utilizó el estándar comercial Lipid Lin-Trol (Sigma) que contiene 8 mg/ml de triglicéridos, 11.6 mg/ml de colesterol y 450 mg/dl de colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad). Las concentraciones de la curva tipo fueron: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 mg ml⁻¹, utilizando agua como diluyente y blanco.

Triglicéridos. Esta variable se determinó utilizando el mismo kit (GOD-PAP, Randox), mencionado anteriormente. Se realizaron diluciones 1:10 de los extractos de hepatopáncreas en SIC. A partir de éstas, se colocaron 20 µl, mas 200 µl de solución reactiva, en una microplaca y se dejaron reaccionar por 20 minutos para leer finalmente su absorbancia a 490 nm. Se utilizó una curva tipo de la misma manera que para las determinaciones en hemolinfa.

6.4.3 Actividad de superóxido dismutasa

La actividad SOD en hemocitos, plasma y hepatopáncreas se determinó de acuerdo al método descrito por McCord y Fridovich, 1969, donde la actividad de esta enzima es cuantificada por espectrofotometría, midiendo el cambio de absorbancia a 550 nm, debido a su efecto inhibitorio sobre la reducción de citocromo-C a causa de los aniones generados por la reacción xantina/xantin oxidasa.

Se preparó una solución reactiva, utilizando: xantina 0.108 mM, citocromo-C 1.1mM, EDTA 10.7mM, buffer fosfatos 50 mM a pH 7.8. Así mismo, se preparó una solución de xantina-oxidasa (XO) y se verificó su eficiencia, colocando 30 µl de ésta, con 1.970 ml de la solución reactiva. Posteriormente se colocó la celda en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU 640) y se registró la cinética del cambio de absorbancia por 2 minutos, que debe ser aproximadamente la siguiente: $\Delta Abs_{550\text{ nm}} \text{XO} = 0.025 \pm 0.005$. En caso de que estos valores se encontraran fuera del rango, se realizó una dilución de la enzima con agua destilada estéril, y se verificó su $\Delta Abs_{550\text{ nm}}$ nuevamente. Una vez ajustada la actividad de la XO a esta lectura, se procedió al análisis de las muestras.

Para determinar la actividad de SOD se utilizaron muestras tanto de plasma como de hemocitos, que fueron previamente sometidos a lisis por sonicación. De los mismos organismos, se obtuvieron muestras de hepatopáncreas (100 mg) que fueron homogenizados (con el equipo Pro Scientific, modelo 200) en 500 µl de buffer fosfatos. Los homogenizados se centrifugaron a 12000 *g* por 12 min a 4°C. El sobrenadante se separó y se almacenó a -20°C para su posterior procesamiento.

Una vez procesadas las diferentes muestras se mezclaron 10 µl de cada una de éstas con 1.970 ml de la solución reactiva. Se registró la cinética del cambio de absorbancia a 550 nm por 2 minutos para obtener el $\Delta\text{Abs}_{550}1$. El tiempo de lectura de las muestras fue determinado de acuerdo a pruebas preliminares, indicadas en el anexo I. Posteriormente se agregaron 20 µl de solución XO a la mezcla anterior, y nuevamente se tomó la lectura por 2 minutos para obtener el $\Delta\text{Abs}_{550}2$.

El porcentaje de inhibición de cada muestra se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = (\Delta\text{Abs}_{550}\text{XO} - \Delta\text{Abs}_{550}\text{M} / \Delta\text{Abs}_{550}\text{XO}) \times 100$$

Donde:

$$\Delta\text{Abs}_{550}\text{M} = \Delta\text{Abs}_{550}2 - \Delta\text{Abs}_{550}1$$

Por otra parte, se calculó la concentración de proteína soluble en las mismas muestras, con el fin de expresar los resultados de actividad SOD en U mg⁻¹ de proteína soluble (U = unidad, que se define como la cantidad necesaria de muestra para inhibir en un 50% la reducción del citocromo-C).

Determinación de proteínas solubles para SOD. Este análisis fue realizado por la técnica de Bradford (1976) adaptado a microplaca mencionado anteriormente. Las muestras fueron diluidas en buffer fosfatos en proporción 1:20 para hepatopáncreas, 1:100 en plasma y 1:10 en el caso del lisado de hemocitos. Se utilizó una curva tipo de ABS (Sigma), con las siguientes concentraciones: 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, mg ml⁻¹, utilizando buffer fosfatos como diluyente y blanco.

Finalmente se calculó la actividad de SOD de la muestra, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{U mg}^{-1} = \frac{(\% \text{ de inhibición}) / (50\% \times \text{ml de la muestra})}{\text{mg ml}^{-1} \text{ de proteína soluble}}$$

6.4.4 Variables inmunológicas

Tiempo de coagulación. Se colectó un volumen constante de hemolinfa en un capilar el cual se invirtió en un sentido y en el otro hasta que la hemolinfa ya no se desplazara a lo largo del capilar, cuantificando con un cronómetro el tiempo que tardó en coagular (Jussila *et al.*, 2001).

Conteo total de hemocitos (CTH). El mismo día del muestreo de los organismos, se realizó el CTH utilizando una cámara de Neubauer para observar al microscopio óptico la muestra de hemolinfa fijada con formaldehído al 4%. En cada una de las muestras se contó el número de células presentes en un volumen de 0.1 μl , distribuidas en un área de 1 mm^2 , que corresponde a las dimensiones de los cuadrantes de la cámara de Neubauer. Se repitió este procedimiento en cuatro cuadrantes distintos, se promedió el número de hemocitos observados y finalmente se multiplicó este valor por 10 000, para obtener el número de células por mililitro de muestra.

Producción de anión superóxido. Esta variable, fue determinada el mismo día del muestreo por espectrofotometría, basado en la reducción del nitroblue de tetrazolio (NBT) a azul de formazan tras la producción de anión superóxido de hemocitos sometidos a un inmunoestimulante (Song y Hsieh, 1994).

Cada muestra fue analizada por triplicado para determinar la producción de aniones superóxido de los hemocitos, en condiciones basales y después de ser activados. Se colocaron 100 μl de hemolinfa en tubos eppendorf y se centrifugaron a 800 g por 8 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante, y los hemocitos fueron lavados con 100 μl de anticoagulante EDTA estéril y recuperados por centrifugación bajo las mismas condiciones. Nuevamente se desechó el sobrenadante y se le agregó a cada tubo 50 μl de laminarina (2 mg ml^{-1} en solución salina balanceada de Hanks: HBSS) y 50 μl de NBT (0.3% en HBSS) para la serie de hemocitos activados. Para la serie de hemocitos en condiciones basales, en lugar de laminarina se agregaron 50 μl de HBSS. Los hemocitos fueron incubados por 30 min a 37°C. Posteriormente, se desecharon las soluciones de laminarina o HBSS y el NBT de cada tubo y los hemocitos fueron fijados con 100 μl de metanol absoluto y lavados con metanol al 70% para ser secados con aire. Una vez secas las muestras, se adicionaron 120 μl de hidróxido de potasio (KOH 2M) y 140 μl de dimetil sulfóxido (DMSO), con el fin de disolver el formazán citoplásmico. La reacción colorimétrica fue medida a una longitud de onda de 630 nm en un lector de microplacas (Spectronic, Genesys 2). Finalmente, la producción de anión superóxido fue expresada como el cociente de la A_{630} de hemocitos activados entre la A_{630} de hemocitos en condiciones basales.

6.4.5 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN de hepatopáncreas de las muestras preliminares y de hemocitos, pleópodos y hepatopáncreas de las muestras obtenidas. A partir de los cefalotórax almacenados a -70°C, se disectó con material estéril y sobre una placa fría, 100 mg de hepatopáncreas, mismos que fueron colocados inmediatamente en 500 μl de reactivo TRIzol® (Invitrogen) para ser procesados al momento. En el caso de los pleópodos, se eliminó con una pipeta el ARN later en el que se encontraban inmersos desde que fueron muestreados y se les agregó TRIzol. Una vez que los tejidos y los hemocitos se encontraban

en TRIzol, se procedió a la extracción de ARN, siguiendo el protocolo que acompaña a este reactivo. Las muestras fueron homogenizadas para romper membranas celulares y que el ARN fuera liberado. Se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y se le agregó cloroformo (200 μ l/1 ml de TRIzol). Posteriormente se agitaron manualmente las muestras, se incubaron 3 minutos más a temperatura ambiente y se centrifugaron (a 12000 g por 15 min a 4°C) para separar las distintas fases. Se recuperó la fase acuosa, se transfirió a otro tubo y se le agregó alcohol isopropílico (500 μ l/1 ml de TRIzol) para precipitar el ARN, dejándose incubar toda la noche. Nuevamente se centrifugaron las muestras (a 12000 g por 10 min. a 4°C), se decantó el sobrenadante, y el pellet de ARN fue lavado con etanol al 75% (1 ml/1 ml de TRIzol) agitándolo cuidadosamente. En seguida se volvió a centrifugar (a 7500 g por 5 min a 4°C), se eliminó el sobrenadante y el pellet fue secado a temperatura ambiente. El ARN fue resuspendido en 50 μ l de agua DEPC para recibir tratamiento con deoxirribonucleasas tipo I (Invitrogene) de acuerdo al protocolo que incluye el producto. Finalmente el ARN fue almacenado a -70°C, hasta su uso para la retrotranscripción.

6.4.6 Retrotranscripción

La síntesis de cADN a partir de mRNA de las muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Improm II (Promega). Este consiste en mezclar 5 μ l de ARN con 1 μ l de Random primers (Promega, A3500), mismos que fueron incubados a 70°C por 10 minutos y colocados en hielo. Posteriormente, a cada muestra se le agregaron 14 μ l de mezcla maestra para retrotranscripción (4 μ l de buffer 5X para Improm II, 2.4 μ l de 25 mM MgCl₂, 1 μ l de 10 mM dNTP's: trifosfatos deoxirribonucleicos, 0.5 μ l de ARNsin, 0.8 μ l de transcriptasa reversa Improm II y 5.3 μ l de agua DEPC). A continuación, las muestras fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, seguidos de 60 min a 45°C y 5 min a 90°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron colocadas en hielo y se procedió a cuantificar el cADN con ayuda de un Biofotómetro (Eppendorf). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

6.4.7 Oligonucleótidos para la detección de Hsp 70 y MnSOD

Para detectar la presencia de MnSOD en el ADN complementario (cADN) de camarón, se utilizaron oligonucleótidos (oligos) o iniciadores (primers) diseñados por Gómez Anduro y colaboradores (2006), en base a la secuencia completa en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (GenBank, DQ005531). En el caso de la de Hsp70, se utilizaron dos combinaciones de oligos diseñados por Reyes (2008), en base a los segmentos más conservados al alinear dos secuencias de esta molécula en peces, *Paralichthys olivaceus* (GenBank, DQ662230) y *Dicentrarchus labrax* (GenBank, AY423555). Todos los oligos fueron probados en muestras preliminares de cADN de hepatopáncreas de camarones que no habían recibido ningún tratamiento. Una vez que los oligos fueron probados y que se estableció su temperatura óptima de alineamiento, se procedió a utilizar los oligos con las

muestras obtenidas de los bioensayos. Las secuencias de los oligos, las temperaturas de alineamiento establecidas y el tamaño de las secuencias blanco, se encuentran especificados en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los primers utilizados para la detección de Hsp 70 y MnSOD en cADN de camarón.

Primer	Secuencia	Tm	pb secuencia blanco
MnSOD fwd	5' - ATGGCTGAGGCAAAGGAAGCTTAC -3'	61	864
MnSOD rev	5' - CTCGTAAGAATGCAGGTCATTGA - 3'		
Hsp70 fwd 1	5' - GACGTGTCCATCCTGACCAT - 3'	65	191
Hsp 70 rev 1	5' - CTCTCACAAGCTGTGCGCAG - 3'		
Hsp70 fwd 1	5' - GACGTGTCCATCCTGACCAT - 3'	65	260
Hsp 70 rev 2	5' - TCGATGCCCTCAAACAGAGA - 3'		

Tm: temperatura de alineamiento, pb: pares de bases, fw: forward, rev: reverse.

6.4.8 Detección de Hsp70 y MnSOD en cADN de camarón por PCR punto final

Con el fin de detectar la presencia de las moléculas de nuestro interés y evaluar la calidad de los cADN obtenidos, se realizó la técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite una rápida amplificación enzimática *in vitro* de segmentos específicos de ADN, para lo cual se requieren de altas temperaturas que desnaturalicen la estructura de doble hélice. Una vez desnaturalizado el fragmento de ADN se incubaba en presencia de dNTP's, la enzima Taq polimerasa, buffer y una temperatura adecuada a la que se puedan alinear los primers al fragmento original, para iniciar su replicación y síntesis. El primer ciclo se caracteriza por la obtención de un producto de longitud indeterminada, sin embargo al paso de cada ciclo se irán acumulando exponencialmente secuencias de longitud conocida, flanqueadas por los primers utilizados, obteniendo al cabo de 30 ciclos mas de 100 millones de copias de la secuencia de nuestro interés (Kramer y Coen, 1999).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el cADN de las muestras y los oligos de MnSOD y la combinación de Forward 1- Reverse 1 para Hsp70, indicados en la Tabla 5. La combinación de Forward 1- Reverse 2 para Hsp70 fue descartada ya que no amplificó con el cADN de las muestras preliminares. Como control se utilizaron primers para el gen parcial de la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, enzima presente en todos los organismos que realizan glucólisis aerobia). Las mezclas de reacción para PCR contenían 2.5 µl de buffer 10X, 2 µl de dNTP's al 2.5 mM, 0.4 U de Taq Polimerasa, 25 pmol de los primers correspondientes, 1 µl de cADN de cada tejido y se aforó con agua estéril para alcanzar un volumen final de 25 µl. Las reacciones fueron amplificadas en un termociclador de gradiente (BioRad, iCycler) con las condiciones descritas en la Tabla 6. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% preteñidos con bromuro de etidio en razón de 4 µl por 50 ml de amortiguador TAE (buffer para electroforesis Tris- Acetato 50X; Kramer y Coen, 1999). Se utilizaron marcadores de peso molecular de 50 o 100 pb (Invitrogen) y se sometió el gel a 100 V

durante 40 minutos. Finalmente, la imagen fue registrada mediante un sistema de fotodocumentación con luz UV (Bio Doc-It, Imaging System UVP).

Tabla 6. Condiciones de PCR utilizado para la amplificación de las secuencias MnSOD y Hsp70.

	Temperatura °C	Tiempo min.	No. de ciclos
Desnaturalización inicial del cADN	94	0.5	1
Desnaturalización inicial del cADN formado	94	1	35
Alineación de los primers	variable *	1.5	35
Elongación del cADN formado	72	2	35
Elongación final	72	7	1
	4	∞	∞

* La temperatura de hibridación o alineamiento depende de la proporción de G/C que contienen los primers utilizados (ver Tabla 5).

6.4.9 Determinación de la secuencia que codifica para Hsp70 en cADN de camarón

Debido a que los primers utilizados para Hsp70 no habían sido probados en camarón, fue necesario amplificar y secuenciar el producto obtenido para analizarlo en el GenBank y verificar que efectivamente corresponde a una secuencia parcial del gen Hsp70 en *Litopenaeus vannamei*. Cabe mencionar que este proceso de secuenciación y verificación no fue necesario para el caso de la secuencia de MnSOD, dado que los oligos utilizados ya habían sido probados para *L. vannamei* (Gómez-Anduro, 2006).

El proceso de secuenciación y verificación para Hsp70 se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

Purificación de productos de PCR. Se realizó una PCR preparativa con un volumen final de 100 µl, utilizando los oligos fw1 - rev1 de Hsp70 y el cADN de hepatopáncreas de las muestras preliminares. La reacción se llevó a cabo con la misma mezcla y bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se realizó una electroforesis en agarosa para separar el producto de PCR y se extrajo la banda de 191 pb con un bisturí estéril en un transiluminador. La recuperación y purificación del ADN se obtuvo siguiendo el protocolo del kit GENE CLEAN® Spin kit (BIO 101).

Clonación de fragmentos de ADN en *E. coli*. A partir de los productos de PCR purificados, se procedió a la clonación con el kit TOPO TA cloning® (Invitrogen) utilizando el plásmido pCR 2.1-TOPO® como vector y células competentes de *E. coli* TOP 10F'. De las clonas positivas obtenidas en agar, se realizó una siembra en medio líquido Luria Bertani (LB) adicionado con ampicilina (100mg/ml) y se dejó incubando toda la noche a 37°C. A partir de las células de este cultivo se procedió a la extracción de ADN plasmídico (ADNp) con el kit RPM (BIO 101) de Q-biogen. Posteriormente, se amplificó por PCR el ADNp y se realizó nuevamente una

electroforesis con el fin de verificar que el fragmento clonado fuera del tamaño esperado: 191 pb.

Obtención y análisis de secuencia que codifica para Hsp70. El ADN plasmídico de Hsp70 fue mandado a secuenciar a la empresa MacroGene, Corea. Con esta secuencia parcial de nucleótidos se realizó un análisis de homología con otras especies para confirmar que el fragmento de ADN amplificado y clonado correspondía a la secuencia de Hsp70. Esta misma secuencia sirvió como base para el diseño de la sonda Taqman descrita a continuación.

6.4.10 Sondas para la cuantificación de transcritos de Hsp 70 y MnSOD

Para la cuantificación de transcritos, se utilizaron sondas Taqman®, las cuales consisten en un tercer oligo cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Esta sonda, presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) que es absorbida al encontrarse unido a un apagador ubicado en el extremo 3'. De tal forma que cuando estas dos moléculas están unidas, la fluorescencia global observada es igual a cero, dicho fenómeno es conocido como FRET (Föster o Fluorecent Resonant Energy Transfer). Las sondas Taqman, por su alta temperatura de alineación, se unen a la secuencia primero que los primers, durante la etapa de alineación. De esta forma, cuando la ADN polimerasa en su paso se encuentra con la sonda y la degrada, libera al reportero del apagador, emitiendo fluorescencia (ABI PRISM, Manual de entrenamiento).

Las sondas Taqman empleadas fueron diseñadas por Applied Biosystems en base a las secuencias parciales que le fueron proporcionadas, mismas que codifican para Hsp 70 y MnSOD en camarón blanco (Tabla 7). Para el control endógeno, se utilizó una sonda comercial (Applied Biosystems) que amplifica la región correspondiente al gen de la proteína ribosomal 18s, ya que es una proteína altamente conservada y de expresión constitutiva.

Tabla 7. Secuencia de las sondas utilizadas para la cuantificación de Hsp 70 y MnSOD en cADN de camarón.

Sonda	Secuencia	Descripción
Hsp 70	CAAGAAGGACATCAGCCAGAACA	Primer
	CTCACAAGCTGTGCGCAG	Reportero (marcador FAM)
	CCTCCTCAAGGCTCTCT	Apagador
MnSOD	CTGAGGCAAAGGAAGCTTACATC	Primer
	TCAATTCCAGTCAGCTCAGCTAAC	Reportero (marcador FAM)
	TCCATCCTGGAGAAGAA	Apagador

6.4.11 Cuantificación de transcritos de Hsp70 y MnSOD por RT-PCR

Para cuantificar el nivel de expresión de Hsp70 y MnSOD tras los estímulos de estrés en camarón blanco, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR). Este, es uno de los métodos más utilizados para cuantificar la expresión génica debido a su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. La reacción de RT-PCR se lleva a cabo mediante la medición de

fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación y registrada por un sistema óptico de detección. Dado que la fluorescencia emitida en cada ciclo, es proporcional a la cantidad de sonda Taqman degradada y esta a su vez es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado, esta técnica permite visualizar el incremento de amplicón a lo largo del tiempo durante la reacción de RT-PCR (ABI PRISM, Manual de entrenamiento).

Validación de ensayos de RT-PCR. En todo ensayo de cuantificación es necesario evaluar el rango dinámico en el cual se van a obtener los resultados para determinar la eficiencia de amplificación y sensibilidad de la técnica. Con este objetivo, se realizó una curva estándar para cada gen blanco (Hsp70 y MnSOD), así como para el control endógeno (18s). Estas curvas fueron realizadas con ADN plasmídico, previamente clonado para cada caso, siguiendo el método anteriormente descrito, a partir de cADN de hemocitos de camarones que no había recibido ningún tratamiento. Se realizaron 5 diluciones seriales en órdenes de 10, cada una con 3 réplicas, partiendo de una concentración inicial de 5 ng/μl de ADNp, en el caso de MnSOD, 18s y de 20 ng/μl para Hsp70. Cada dilución, más los componentes de la reacción indicados en la Tabla 8, fueron colocados en un pozo de microplaca para RT-PCR. Las curvas estándar fueron amplificadas en un termociclador ABI PRISM 7000 (Sequence Detection System, Applied Biosystems) con el programa especificado en la Tabla 9.

Para los ensayos de cuantificación, se debe considerar la fase geométrica de amplificación, ya que es en ésta donde los reactivos se encuentran en abundancia y la eficiencia de la reacción es muy cercana al 100%. Dentro de la fase geométrica de amplificación, se fija un punto de intensidad de fluorescencia o umbral de detección, en el cual todas las muestras pueden ser comparadas entre sí. Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar al umbral de detección, se le conoce como Ct (treshhold cycle, ciclo de umbral de detección). De esta forma, el Ct es un número fraccional que indica cuántos ciclos le tomó a cada muestra generar la cantidad de fluorescencia suficiente para alcanzar el umbral de detección. El valor de Ct es directamente proporcional a la cantidad inicial de templado y es el fundamento para calcular la cantidad de mARN o ADN. Mientras mayor cantidad de ADN se encuentre en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección (ABI PRISM, Manual de entrenamiento).

A partir de los resultados obtenidos, se construyó una gráfica de los valores de Ct versus el log de la concentración (ng de ADN) y de esta gráfica se realizó una regresión lineal con el fin de observar que el valor de la pendiente sea cercano a -3.32, lo que corresponde a una eficiencia de amplificación igual al 100%. La fórmula empleada para calcular la eficiencia de amplificación a partir de la pendiente es:

$$\text{Eficiencia} = (10^{(-1/m)}) - 1$$

Una vez establecido el rango dinámico y la eficiencia de la reacción, se procedió al análisis de las muestras, calculando la cantidad de transcritos por el método de cuantificación relativa. Para que éste cálculo sea válido, es necesario comprobar que la eficiencia de amplificación del gen blanco y la del control endógeno sea aproximadamente igual. Con el fin de verificar esto, se utilizaron los datos de las curvas estándar o de rango dinámico de cada gen y se graficó el log de la concentración de ADN versus el ΔCt ($Ct_{\text{gen blanco}} / Ct_{\text{control endógeno}}$). Esta gráfica se linearizó y la pendiente de esta recta debe ser menor 0.1 para validar el método de cuantificación empleado.

Tabla 8. Mezcla para una reacción de RT-PCR

	1 reacción (μ l)
Sonda Taqman ⁺	1.25
Master Mix	12.5
ADNp o cADN	1*
Agua estéril	10.25
Volumen total	25

⁺Para 18s, Hsp 70 y MnSOD, respectivamente. * En el caso de Hsp 70 se utilizaron 2 μ l de ADNp o cADN

Tabla 9. Parámetros del ciclo térmico que se utilizó para la amplificación de las secuencias de 18s, MnSOD y Hsp70 en RT-PCR

	Temperatura °C	Tiempo	No. de ciclos
Activación enzimática	50	2 min	1
Desnaturalización inicial del ADN	95	10 min	1
Desnaturalización inicial del ADN formado	95	15 seg	40
Alineación de los primers y extensión de producto	60	1 min	40

Cuantificación de transcritos en muestras. Se evaluó el nivel de expresión de Hsp70 y MnSOD tras los estímulos de estrés, en las muestras de cADN de hemocitos de los distintos grupos experimentales (C, ST 32°C y ST 35°C). Para esto, se cuantificó inicialmente, el cADN total de todas las muestras con ayuda de un biofotómetro (Eppendorf) y se homogenizó su concentración a 1000 ng/ μ l, utilizando agua estéril, en los casos que fue necesaria alguna dilución. Una vez homogenizada la concentración de ADN de las muestras, se prepararon las reacciones como se indica en la Tabla 8, utilizando las sondas de Hsp70 y MnSOD, y como control endógeno se utilizó 18s. Las muestras de los diferentes tratamientos fueron analizadas por triplicado a través de RT-PCR en el termociclador ABI PRISM 7000, bajo las condiciones indicadas en la Tabla 9.

Para calcular el número de transcritos en las muestras de hemocitos para cada gen, se utilizó el método comparativo o de cuantificación relativa, que emplea el algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (de acuerdo al protocolo descrito en el manual: User Bulletin #2 ABI PRISM 7700, 1997). Este método permite conocer el incremento de transcritos tomando como referencia activa la

expresión del control endógeno (18s) para normalizar los resultados y asegurar que las variaciones observadas sean realmente debidas a cambios de expresión y no a la cantidad variable de muestra añadida en los ensayos. Una vez normalizado el resultado de expresión con respecto al control endógeno, se divide entre el valor de otro ensayo elegido como calibrador, que en este caso fue el grupo control (C).

Los cálculos de la cuantificación se realizaron de la siguiente manera:

$$\text{Expresión génica (unidades relativas)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Hsp o MnSOD}} - Ct_{18s}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - Ct_{\text{control}}$$

6.5 Análisis Estadístico

Todos los análisis fueron realizados con el programa STATISTICA (versión 5.5), utilizando un nivel de significancia del 95% ($P \leq 0.05$), aunque la probalidades entre $0.05 < X < 0.1$, se indicaron y se consideraron como efectos marginales. Inicialmente, se verificó que todos los datos presentaran una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y que sus varianzas fueran homogéneas (prueba de Bartlett). En los casos donde alguna de estas condiciones no se cumplió, los datos fueron transformados (Zahr, 1999) y probados nuevamente.

En el caso de las variables fisicoquímicas del agua, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) bifactorial considerando el efecto del tiempo además de la temperatura sobre los niveles de oxígeno disuelto.

Con el fin de evaluar la influencia del estrés térmico sobre las diferentes variables analizadas en el camarón, y considerando que se obtuvieron muestras de organismos en diferentes estadios de muda (a excepción del análisis molecular), se realizó un ANOVA bifactorial. Este análisis nos permitió evaluar el efecto combinado de los 2 factores sobre las distintas variables, considerando al estrés térmico como primer factor y el estadio de muda como segundo factor con 3 niveles: postmuda (considerando los organismos en postmuda tanto temprana como tardía, estadios A y B respectivamente), intermuda (estadio C) y premuda (temprana y tardía, que considera los estadios D0 a D2). Sólo en caso de obtener valores significativos, se procedió a la comparación de medias individuales por medio de pruebas *a posteriori* de Tukey. De lo contrario, cuando se encontraron efectos significativos de uno o ambos factores, se muestran las medias globales por condición de estrés o por estadio de muda, indicando las diferencias significativas entre ellas.

VII. RESULTADOS

7.1 Primer Bioensayo. Estrés por hipertermia a corto plazo: 28 - 32°C

7.1.1 Oxígeno Disuelto

La concentración de oxígeno disuelto en el agua de las unidades experimentales durante el bioensayo, se muestra en la Figura 5. Desde el inicio del experimento las concentraciones de oxígeno disuelto (4.78 mg L^{-1} para el grupo control y 4.72 mg L^{-1} para el grupo ST32°C) fueron menores al nivel de saturación (74.45 y 73.52% a 35 ups y 28°C). Niveles similares se observaron en las unidades de mantenimiento de donde se muestrearon los organismos del grupo control absoluto y que presentaban valores de oxígeno disuelto de 4.6 mg L^{-1} . El ANOVA bifactorial indica un efecto significativo tanto por el tiempo de exposición como por la temperatura. Aunque la interacción no fue significativa, se observa que la disminución de oxígeno a lo largo del tiempo fue mas pronunciada en el grupo de estrés térmico que en el grupo control. Después de 60 y 180 minutos de haber incrementado la temperatura, la concentración de oxígeno en el grupo de estrés (4.27 y 4.16 mg L^{-1} , respectivamente) fue significativamente menor que la registrada al tiempo 0' de este mismo grupo (4.72 mg L^{-1}) y que la del grupo control a los 60 y 180' (4.62 y 4.56 mg L^{-1} , respectivamente) (Fig. 5). La concentración de oxígeno obtenida para el grupo estrés al cabo de 180 minutos representa un nivel de saturación del 68.98% mientras que para el grupo control es del 71.03%.

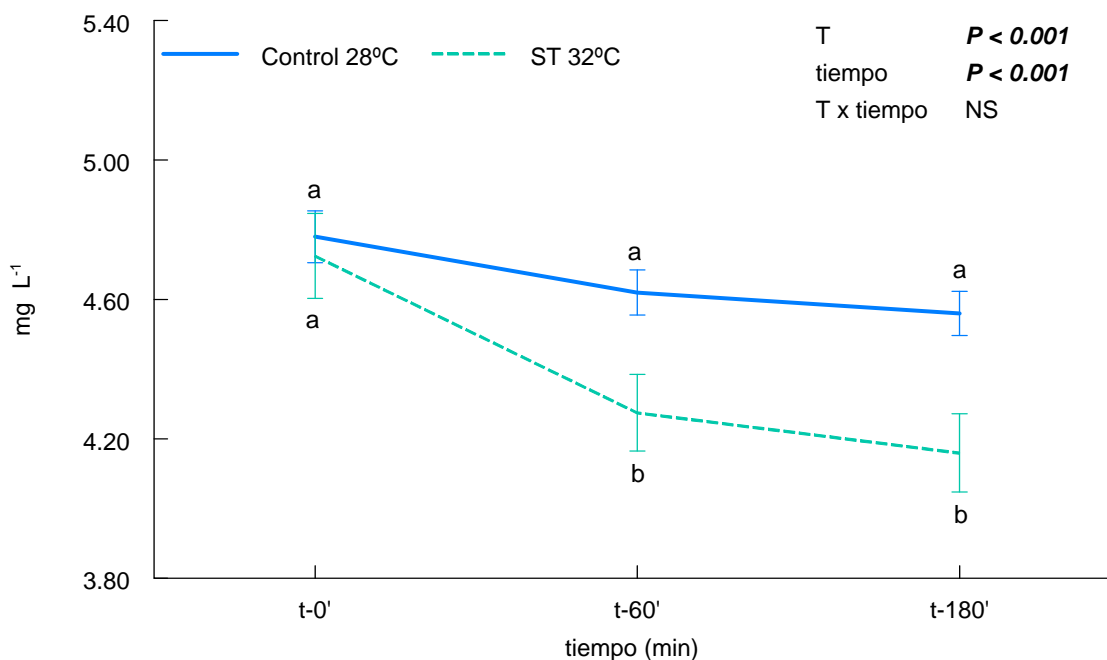


Fig. 5 Concentración de oxígeno disuelto en unidades experimentales (medias \pm error estándar) sometidas a diferentes temperaturas durante la prueba; al iniciar (t0), al minuto 60 (t60) y al finalizar (t180). Control n=30 tinas, ST 32°C: shock térmico n=21 tinas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias. T: Temperatura. NS: no significativo.

7.1.2 Variables fisiológicas en hemolinfa

En la tabla 10 se muestran las medias individuales por condición de estrés y por estadio de muda de las diferentes variables fisiológicas en hemolinfa, así como los resultados del ANOVA bifactorial correspondiente. El grupo de control absoluto (CA) fue eliminado del análisis estadístico debido a que al menos uno de los estadios de muda se encontraba pobremente representado, además de no presentarse diferencias significativas con respecto al grupo control (C) (ver Anexo II).

Tabla 10. Variables fisiológicas en hemolinfa (medias individuales \pm error estándar) en los distintos estadios de muda de *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M), se muestran en las 3 últimas columnas.

	Estadio	Control 28°C	ST 32°C	ET	M	ET x M
Glucosa (mg dl ⁻¹)	Post-m	16.50 \pm 3.21	37.54 \pm 10.21	< 0.05	NS	NS
	Inter-m	22.73 \pm 1.68	26.26 \pm 2.19			
	Pre-m	23.35 \pm 2.13	25.44 \pm 3.56			
Lactato (mg dl ⁻¹)	Post-m	15.97 \pm 3.35	15.86 \pm 3.84	NS	NS	NS
	Inter-m	7.35 \pm 1.17	10.20 \pm 2.73			
	Pre-m	17.92 \pm 7.17	17.71 \pm 6.62			
Triglicéridos (mg dl ⁻¹)	Post-m	37.74 \pm 3.07	63.70 \pm 8.23	NS	< 0.05	NS
	Inter-m	82.20 \pm 9.26	87.18 \pm 14.92			
	Pre-m	84.45 \pm 18.75	96.09 \pm 22.12			
Proteínas totales (mg ml ⁻¹)	Post-m	80.07 \pm 5.92	67.18 \pm 4.20	< 0.05	NS	NS
	Inter-m	87.42 \pm 4.19	79.50 \pm 4.52			
	Pre-m	85.30 \pm 5.09	75.94 \pm 2.33			
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	Post-m	59.06 \pm 7.96	56.28 \pm 8.49	< 0.05	NS	NS
	Inter-m	72.12 \pm 5.84	58.74 \pm 3.53			
	Pre-m	72.53 \pm 3.01	59.36 \pm 5.59			
Osmolaridad (mmol kg ⁻¹)	Post-m	794.75 \pm 3.90	800.33 \pm 29.50	NS	NS	NS
	Inter-m	786.00 \pm 6.03	788.33 \pm 5.90			
	Pre-m	800.12 \pm 14.19	827.62 \pm 13.55			

NS: no significativo. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Para osmolaridad; Control n = 3, 4 y 6, ST 32°C: shock térmico n= 3, 3 y 8. Para las demás variables; Control n = 5, 7 y 6, ST 32°C n= 5, 7 y 5 en los estadios de post, inter y premuda, respectivamente.

Tal como se puede apreciar, se presentó un efecto significativo por estrés térmico, para los niveles de glucosa, proteínas y hemocianina en hemolinfa. Para mayor claridad, en la Fig. 6 se grafican las medias globales (por condición de estrés) para todas las variables fisiológicas de hemolinfa.

En particular, se puede apreciar el incremento significativo de la glucosa en el grupo de ST 32°C respecto al control y el decremento significativo en los niveles de proteínas totales y hemocianina en el grupo de estrés. Por otro lado, se observó un efecto significativo del estadio de muda por sí solo, en los niveles de triglicéridos en hemolinfa, disminuyendo en el estadio de postmuda, respecto a los organismos que se encontraban en intermuda y premuda (Fig. 7).

Finalmente, no se observó ningún efecto significativo para los niveles de lactato y presión osmótica en hemolinfa.

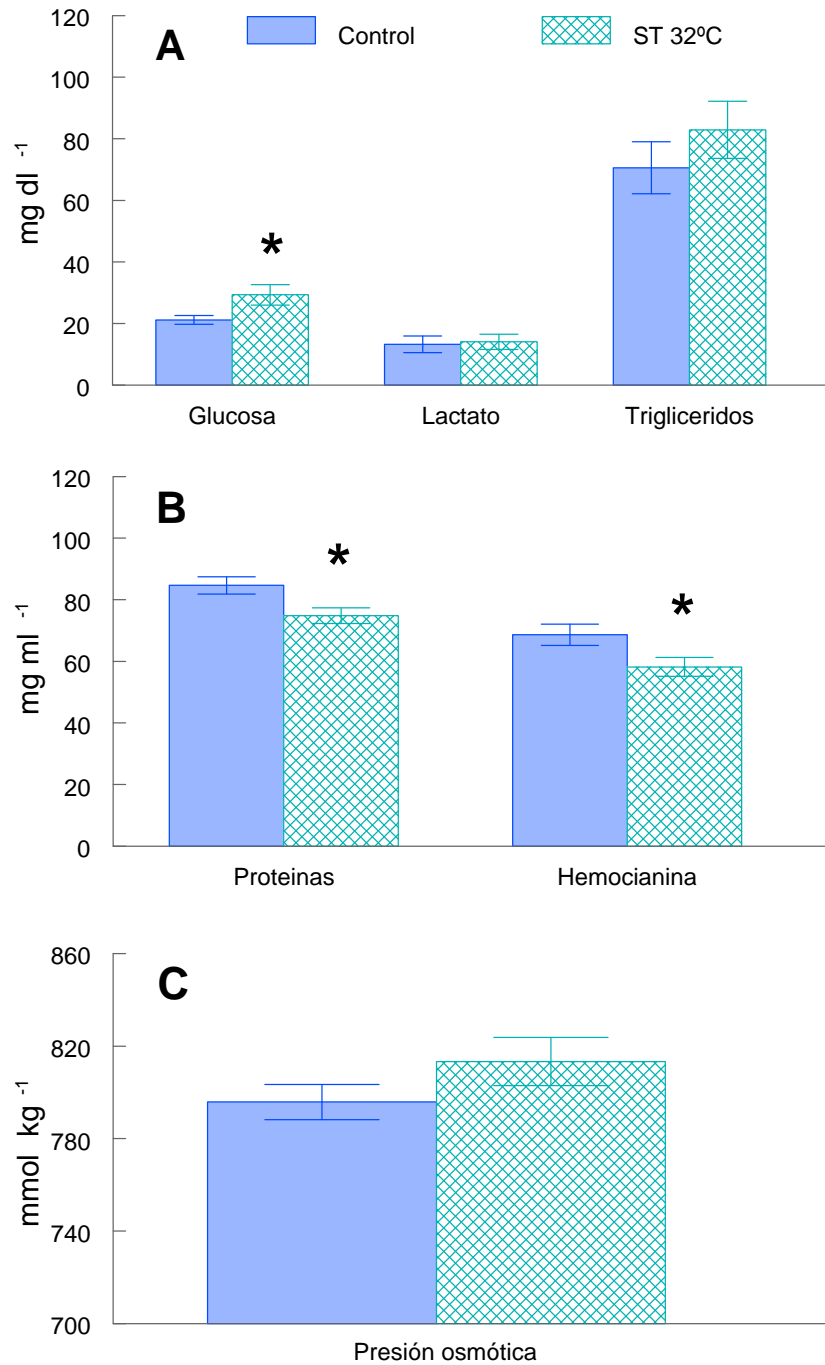


Fig. 6. Variables fisiológicas en hemolinfa de camarones sometidos a diferentes temperaturas (medias globales \pm error estándar). *Indica diferencia significativa respecto al control. Control n=18, 18 y 15, ST 32°C: Shock térmico n=17, 17 y 14 para gráfica A, B y C, respectivamente.

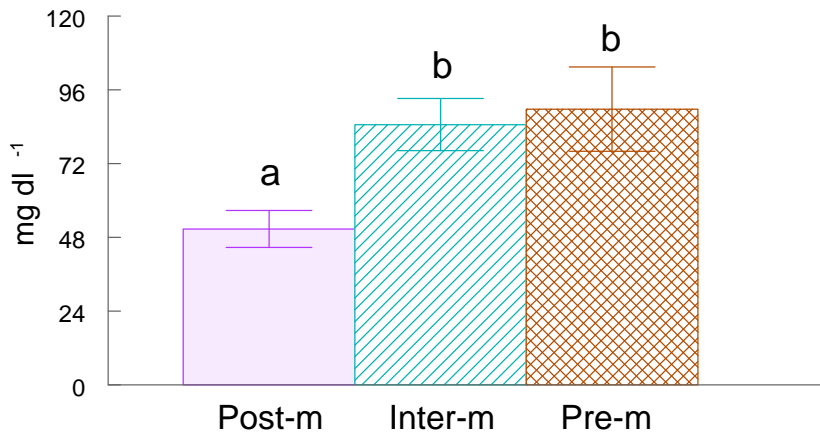


Fig. 7. Concentración de triglicéridos en hemolinfa de camarones en distintos estadios de muda (medias globales Post-m: postmuda n=10, Inter.-m: intermuda n=14, Pre-m: premuda n=11. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias.

7.1.3 Variables inmunológicas

El tiempo de coagulación no resultó afectado por la condición de hipertermia, el ciclo de muda, ni por la interacción de éstos dos factores (Tabla 11).

Tabla 11. Tiempo de coagulación en hemolinfa (medias individuales \pm error estándar) en los distintos estadios de muda de *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M), se muestran en las 3 últimas columnas.

	Estadio	Control 28°C	ST 32°C	ET	M	ET x M
Tiempo de Coagulación (seg)	Post-m	23.67 \pm 0.88	19.50 \pm 5.50	NS	NS	NS
	Inter-m	14.25 \pm 2.93	17.67 \pm 5.46			
	Pre-m	17.50 \pm 3.59	18.00 \pm 1.84			

NS: no significativo. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Control n = 3, 4 y 6, ST 32°C: shock térmico n=2, 3 y 7 para los estadios de post, inter y premuda, respectivamente.

7.2. Segundo Bioensayo. Estrés por hipertermia a corto plazo: 28 - 35°C

7.2.1 Oxígeno Disuelto

Se realizaron mediciones de oxígeno únicamente al inicio y final de las pruebas de hipertermia. Esto debido a que en el bioensayo anterior, los cambios en los niveles de oxígeno se registraron principalmente a los 180 minutos después de iniciada la prueba (Fig. 5).

Desde el inicio de este bioensayo, las concentraciones de oxígeno disuelto (4.57 y 4.60 mg L⁻¹ para Control y ST-35°C respectivamente) resultaron menores que el nivel de saturación (71.18 y 71.65% a 35 ups y 28°C), de igual forma que en el experimento anterior. Al realizar el ANOVA bifactorial, se observó una disminución en los niveles de oxígeno, debido únicamente al tiempo de exposición (medias globales, tiempo 0' = 4.59 mg L⁻¹ y tiempo 180' = 4.06 mg L⁻¹) y no por el factor de temperatura. Sin embargo y aún cuando la interacción no fue significativa, se observa que la concentración de oxígeno disminuyó de manera mas pronunciada en el grupo de shock térmico al minuto 180 (3.92 mg L⁻¹ - 67.93 % de saturación), registrándose una diferencia significativa con respecto al tiempo 0' de ambos grupos. No obstante, aunque la concentración de oxígeno (mg L⁻¹) en el grupo de shock térmico al minuto 180 resultó menor a la del grupo control a ese mismo tiempo (4.21 mg L⁻¹- 68.83 % de saturación), no hay diferencia significativa entre ambos valores (Fig. 8).

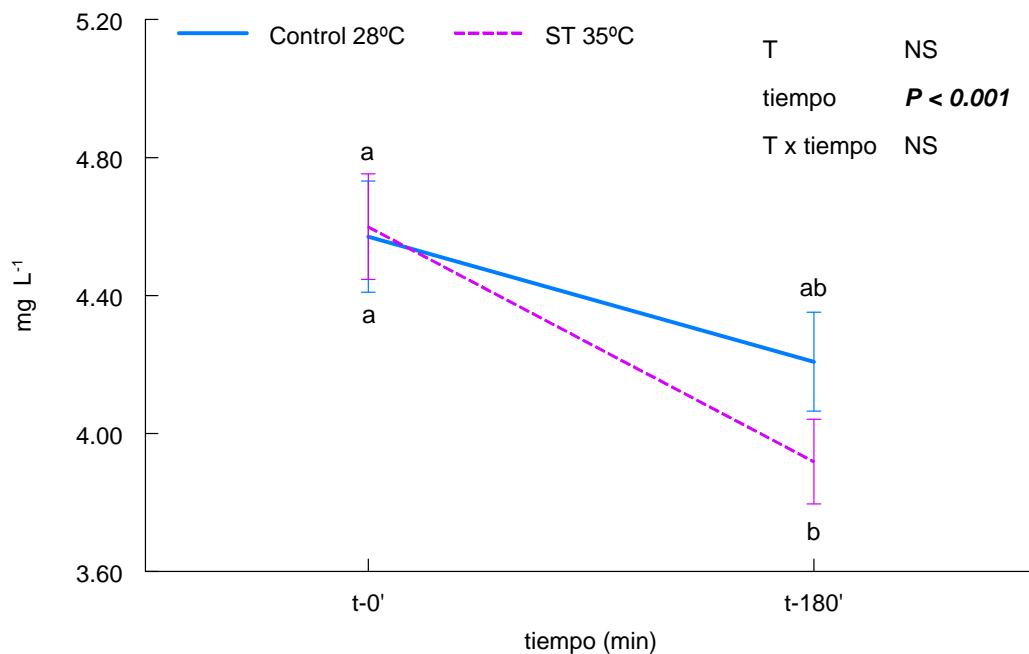


Fig. 8 Concentración de oxígeno disuelto en unidades experimentales (medias ± error estándar) sometidas a diferentes temperaturas durante la prueba; al iniciar (t0') y al finalizar (t180'). Control n=48 tinas, ST 35°C: shock térmico n=52 tinas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias. T: Temperatura. NS: no significativo.

7.2.2 Variables fisiológicas en hemolinfa

En la tabla 12 se muestran las medias individuales por condición de estrés y por estadio de muda de las diferentes variables fisiológicas en hemolinfa, así como los resultados del ANOVA bifactorial correspondiente.

Tabla 12. Variables fisiológicas en hemolinfa (medias individuales \pm error estándar) en los distintos estadios de muda de *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M), se muestran en las 3 últimas columnas.

	Estadio	Control 28°C	ST 35°C	ET	M	ET x M
Glucosa (mg dl ⁻¹)	Post-m	37.09 \pm 8.13	21.09 \pm 6.53			
	Inter-m	31.35 \pm 2.15	17.33 \pm 1.22	<0.01	NS	<0.05
	Pre-m	20.25 \pm 1.91	21.97 \pm 2.33			
Lactato (mg dl ⁻¹)	Post-m	5.74 \pm 1.10	5.27 \pm 0.72			
	Inter-m	9.00 \pm 1.26	4.72 \pm 0.72	NS	NS	NS
	Pre-m	8.13 \pm 2.63	6.06 \pm 1.44			
Triglicéridos (mg dl ⁻¹)	Post-m	75.89 \pm 15.15	91.00 \pm 18.84			
	Inter-m	62.81 \pm 10.11	95.90 \pm 11.11	NS	NS	NS
	Pre-m	82.48 \pm 8.23	76.01 \pm 10.22			
Proteínas totales (mg ml ⁻¹)	Post-m	138.83 \pm 5.08	110.85 \pm 1.39			
	Inter-m	146.25 \pm 7.77	141.44 \pm 4.09	<0.01	0.05	NS
	Pre-m	143.42 \pm 3.16	129.65 \pm 5.92			
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	Post-m	85.95 \pm 5.28	93.64 \pm 3.39			
	Inter-m	103.68 \pm 6.73	101.85 \pm 4.65	NS	NS	NS
	Pre-m	109.08 \pm 4.17	95.59 \pm 3.66			
Osmolaridad (mmol kg ⁻¹)	Post-m	804.00 \pm 4.09	815.00 \pm 6.94			
	Inter-m	778.83 \pm 2.96	832.50 \pm 13.24	<0.001	<0.01	NS
	Pre-m	817.20 \pm 12.42	873.20 \pm 15.42			

NS: no significativo. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Para osmolaridad: Control n = 5, 6 y 5, ST 35°C: shock térmico n=4, 6 y 5. Para las demás variables; Control n= 4, 4 y 8, ST 35°C n= 2, 6 y 10 en los estadios de post, inter y premuda, respectivamente.

Como se puede apreciar en la tabla anterior, se presentó un efecto significativo por estrés térmico para los niveles de glucosa circulante, además de una interacción significativa con el estadio de muda. También se observó un efecto significativo por la condición de estrés y del estadio de muda para los niveles de proteínas totales y para la osmolaridad en hemolinfa. Finalmente, no se observaron diferencias significativas por efecto de estrés térmico, el estadio de muda ni por interacción de ambos factores para los niveles de lactato, triglicéridos y hemocianina en hemolinfa.

Los efectos por hipertermia sobre las variables fisiológicas circulantes se pueden observar con mayor claridad en la Fig. 9, donde se grafican las medias globales por condición de estrés. En particular, se puede distinguir un decremento significativo de la glucosa y de las proteínas totales en hemolinfa en el grupo de ST 35°C respecto al control y un incremento significativo en los niveles de la osmolaridad en el grupo de estrés.

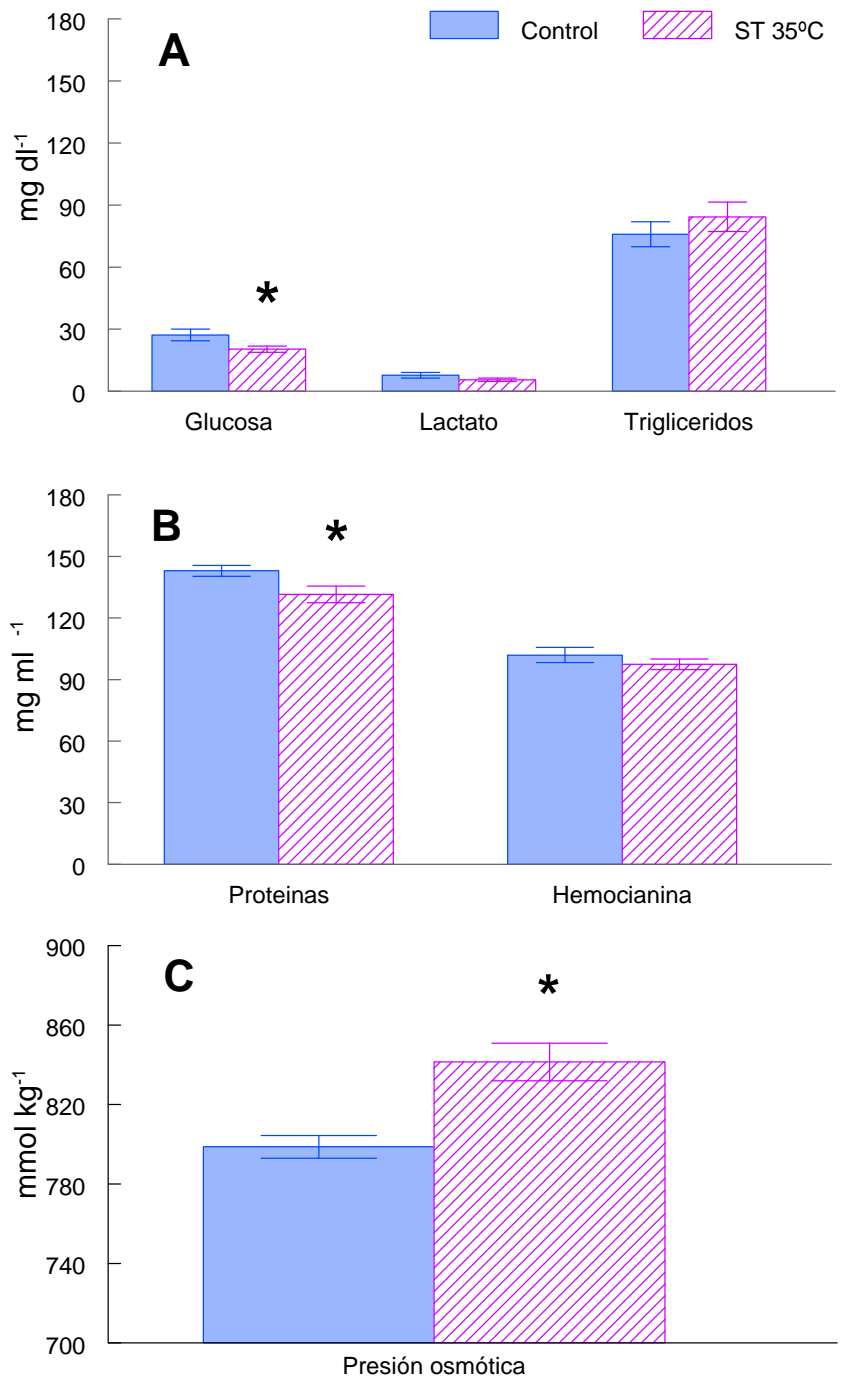


Fig. 9. Variables fisiológicas en hemolinfa de camarones sometidos a diferentes temperaturas (medias globales \pm error estándar). *Indica diferencia significativa respecto al control. Control n=16, ST 35°C: Shock térmico n=18, 18 y 15, para gráfica A, B y C, respectivamente.

En el caso de la glucosa en hemolinfa, se presenta además una interacción significativa entre la condición de estrés y el estadio de muda, con una disminución de esta variable en organismos en postmuda e intermuda del grupo ST 35°C, más no en premuda (Fig. 10).

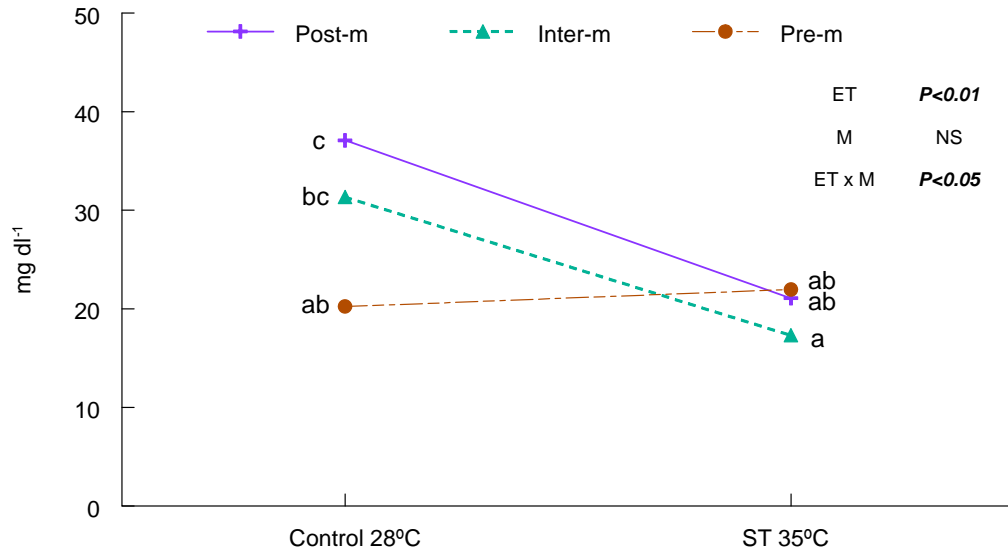


Fig. 10. Concentración de glucosa en hemolinfa (medias individuales) por estadios de muda en *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M) se muestran en la gráfica. Control n = 4, 4 y 8, ST 35°C: shock térmico n=2, 6 y 10 para los estadios de post, Inter y premuda respectivamente. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias.

Como se mencionó anteriormente, los niveles de proteína total en hemolinfa presentan un efecto significativo por estadio de muda, con una disminución en postmuda con respecto a la intermuda (Fig.11). De igual manera, el estadio de muda afectó significativamente la presión osmótica en hemolinfa de camarones, presentando valores más elevados en premuda comparado con los estadios de intermuda y postmuda (Fig. 12).

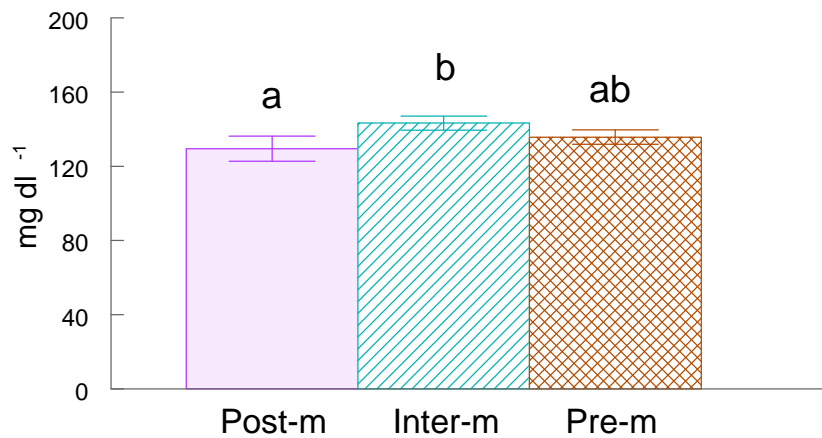


Fig. 11. Concentración de proteínas totales en hemolinfa de camarones en distintos estadios de muda (medias globales \pm error estándar). Post-m: postmuda n=6, Inter.-m: intermuda n=10, Pre-m: premuda n=18. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias.

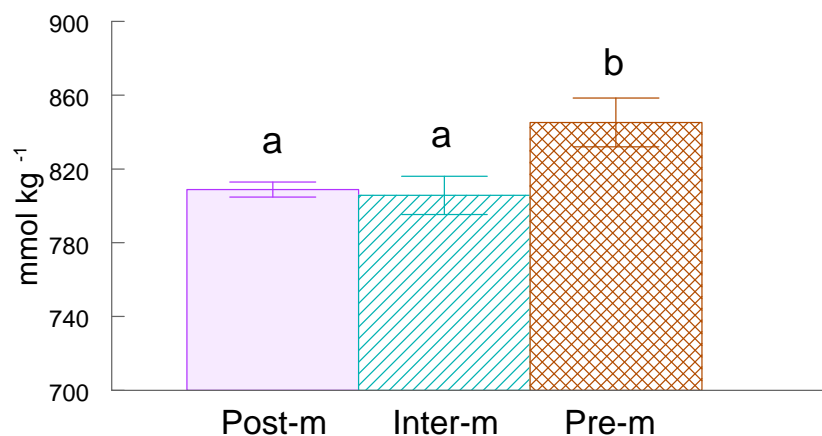


Fig. 12. Presión osmótica en hemolinfa de camarones en distintos estadios de muda (medias globales \pm error estándar). Post-m: postmuda n=9, Inter.-m: intermuda n=12, Pre-m: premuda n=10. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias.

7.2.3 Variables fisiológicas en tejidos

Hepatopáncreas

En la tabla 13 se muestran las medias individuales por condición de estrés y por estadio de muda de las diferentes variables fisiológicas en hepatopáncreas, así como los resultados del ANOVA bifactorial correspondiente.

Tabla 13. Variables fisiológicas en hepatopáncreas (medias individuales \pm error estándar) en los distintos estadios de muda de *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M), se muestran en las 3 últimas columnas.

	Estadio	Control 28°C	ST 35°C	ET	M	ET x M
% de humedad	Post-m	71.45 \pm 3.38	69.42			
	Inter-m	67.74 \pm 2.91	70.10 \pm 2.36	NS	NS	NS
	Pre-m	66.97 \pm 1.47	65.88 \pm 1.96			
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	Post-m	178.83 \pm 40.04	127.68			
	Inter-m	137.34 \pm 14.03	172.67 \pm 19.20	NS	NS	NS
	Pre-m	138.95 \pm 11.25	143.00 \pm 10.03			
Glucógeno (mg g ⁻¹)	Post-m	6.59 \pm 0.90	9.77			
	Inter-m	5.93 \pm 1.54	8.03 \pm 1.31	< 0.05	NS	NS
	Pre-m	6.14 \pm 0.35	7.15 \pm 0.60			
Lactato (mg g ⁻¹)	Post-m	0.15 \pm 0.09	0.07			
	Inter-m	0.19 \pm 0.06	0.13 \pm 0.02	NS	NS	NS
	Pre-m	0.14 \pm 0.04	0.17 \pm 0.05			
Lípidos totales (mg g ⁻¹)	Post-m	308.30 \pm 39.05	312.09			
	Inter-m	298.58 \pm 12.68	291.05 \pm 27.92	NS	NS	NS
	Pre-m	280.40 \pm 19.43	272.17 \pm 11.74			
Triglicéridos (mg g ⁻¹)	Post-m	155.16 \pm 15.84	165.86			
	Inter-m	161.09 \pm 8.47	157.72 \pm 8.39	NS	NS	NS
	Pre-m	165.66 \pm 15.66	125.73 \pm 9.81			

NS: no significativo. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Control n = 4, 4 y 8, ST 35°C: shock térmico n=1, 6,10 para los estadios de post, inter y premuda, respectivamente. Valores de mg g⁻¹ en peso seco.

Como se observa en la tabla anterior, el glucógeno presenta un efecto significativo únicamente por la condición de estrés. Las demás variables fisiológicas en hepatopáncreas no presentaron un efecto significativo por la condición de estrés, por el estadio de muda o por la interacción de ambos factores.

En la Fig. 13 se puede apreciar con mayor detalle el efecto por hipertermia, al graficar las medias globales (por condición de estrés) para todas las variables fisiológicas de hepatopáncreas, que no fue significativo para proteínas, lípidos, triglicéridos y lactato. Sin embargo, los niveles de glucógeno aumentaron significativamente en el grupo de shock térmico respecto al control (Fig.13B).

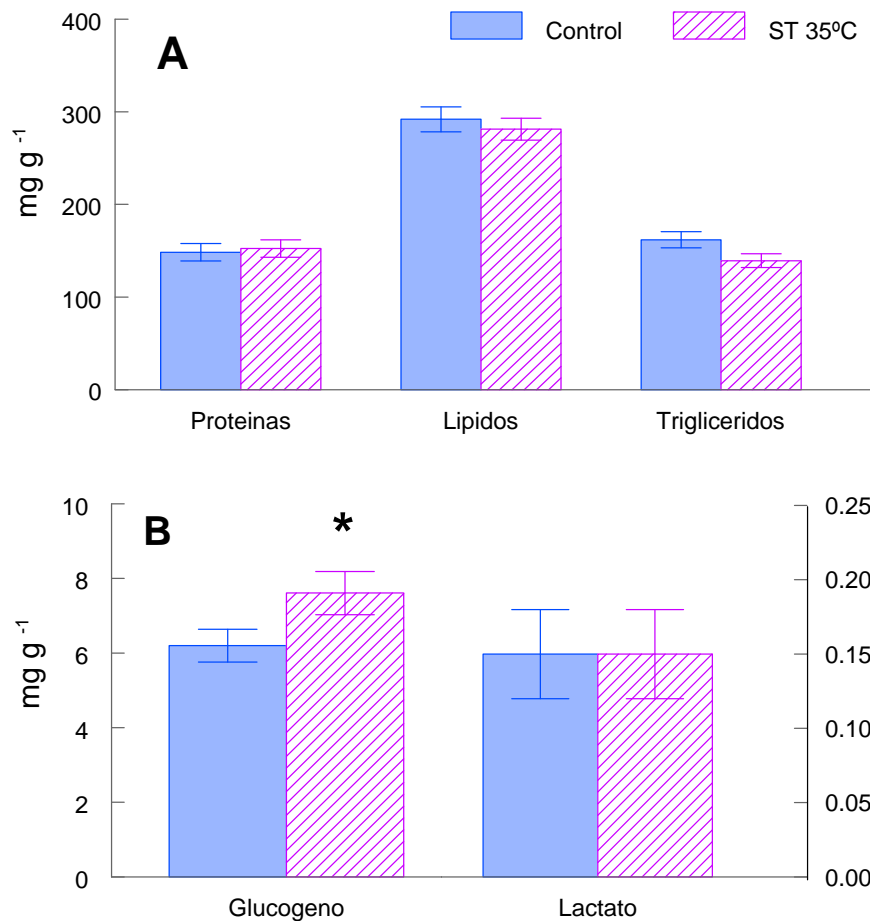


Fig. 13. Variables fisiológicas en hepatopáncreas de camarones sometidos a diferentes temperaturas (medias globales \pm error estándar). *Indica diferencia significativa respecto al control. Control n=16, ST 35°C: Shock térmico n=17 para las gráficas A y B.

Músculo

En la tabla 14 se muestran las medias individuales por condición de estrés y por estadio de muda de las diferentes variables fisiológicas en músculo, así como los resultados del ANOVA bifactorial correspondiente.

Tabla 14. Variables fisiológicas en músculo (medias individuales \pm error estándar) en los distintos estadios de muda de *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M), se muestran en las 3 últimas columnas.

	Estadio	Control 28°C	ST 35°C	ET	M	ET x M
% de humedad	Post-m	74.70 \pm 0.36	75.83			
	Inter-m	72.14 \pm 1.41	74.29 \pm 0.22	NS	NS	NS
	Pre-m	74.28 \pm 0.54	73.76 \pm 0.67			
Proteínas totales (mg g ⁻¹)	Post-m	663.41 \pm 72.00	759.46			
	Inter-m	545.00 \pm 46.25	635.65 \pm 63.39	NS	NS	NS
	Pre-m	643.79 \pm 46.37	587.13 \pm 49.84			
Glucógeno (mg g ⁻¹)	Post-m	3.05 \pm 0.73	4.16			
	Inter-m	2.98 \pm 0.73	2.54 \pm 0.56	NS	NS	NS
	Pre-m	3.69 \pm 0.64	3.16 \pm 0.39			
Lactato (mg g ⁻¹)	Post-m	6.16 \pm 0.23	7.97			
	Inter-m	6.57 \pm 0.92	5.25 \pm 0.32	NS	NS	NS
	Pre-m	6.10 \pm 0.41	6.05 \pm 0.37			

NS: no significativo. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Control n = 4, 4 y 8, ST 35°C: shock térmico n=1, 6,10 para los estadios de post, inter y premuda, respectivamente. Valores de mg g⁻¹ en peso seco.

Como se puede apreciar en la tabla anterior, no se presentó un efecto significativo por condición de estrés, estadio de muda o bien por la interacción de ambos factores para el porcentaje de humedad, los niveles de proteína, glucógeno y lactato en músculo. Aunque no se haya observado un efecto significativo por hipertermia, las medias globales (por condición de estrés) para las variables fisiológicas analizadas en músculo se grafican en la Fig 14.

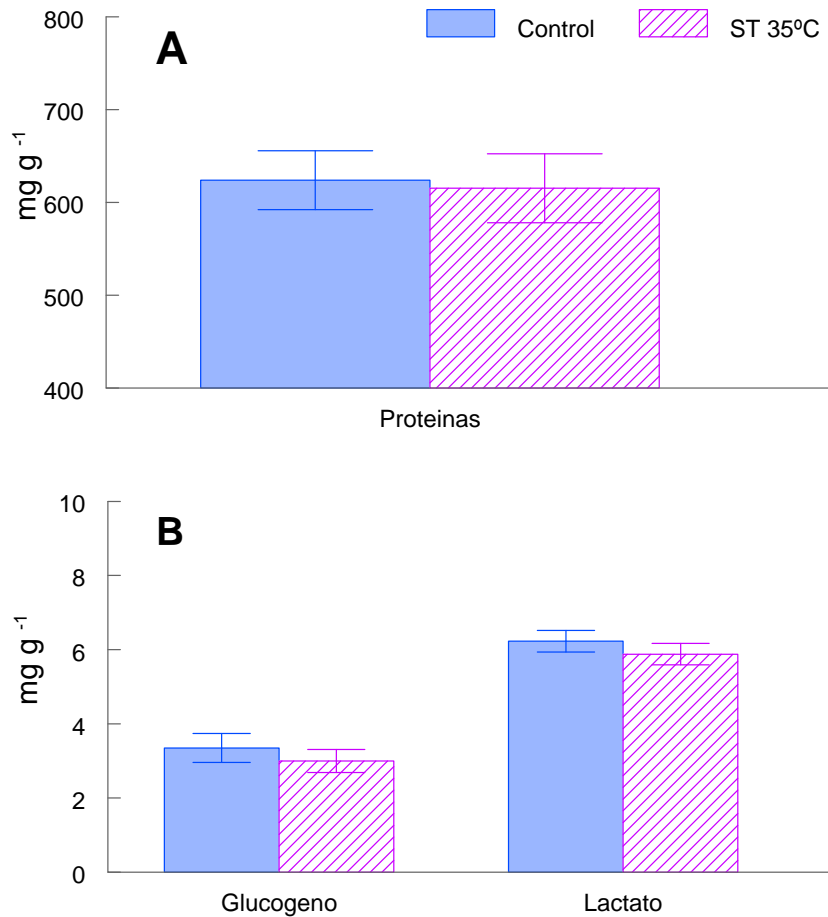


Fig. 14. Variables fisiológicas en músculo de camarones sometidos a diferentes temperaturas (medias globales \pm error estándar). *Indica diferencia significativa respecto al control. Control n=16, ST 35°C: Shock térmico n=17 para las gráficas A y B.

7.2.4 Actividad superóxido dismutasa (SOD)

En la tabla 15 se muestran las medias individuales por condición de estrés y por estadio de muda de la actividad SOD en hemocitos, plasma y hepatopáncreas, así como los resultados del ANOVA bifactorial correspondiente. Como se muestra en la siguiente tabla, la actividad de SOD en hemocitos presenta un efecto significativo únicamente por la condición de estrés. Asimismo, se puede apreciar que la actividad de esta enzima en plasma y hepatopáncreas, no se vio afectada por la condición de hipertermia, por el ciclo de muda de los organismos ni por la interacción de ambos factores.

Tabla 15. Actividad de superóxido dismutasa (medias individuales \pm error estándar) en los distintos estadios de muda de *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M), se muestran en las 3 últimas columnas.

	Estadio	Control 28°C	ST 35°C	ET	M	ET x M
Hemocitos (U mg ⁻¹)	Post-m	9.07 \pm 4.72	4.11 \pm 2.17	< 0.05	NS	NS
	Inter-m	7.87 \pm 1.63	4.35 \pm 0.77			
	Pre-m	4.81 \pm 0.42	3.40 \pm 0.98			
Plasma (U mg ⁻¹)	Post-m	0.33 \pm 0.04	0.24 \pm 0.03	NS	NS	NS
	Inter-m	0.27 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05			
	Pre-m	0.36 \pm 0.05	0.36 \pm 0.06			
Hepatopáncreas (U mg ⁻¹)	Post-m	2.01 \pm 0.09	1.73 \pm 0.42	NS	NS	NS
	Inter-m	2.05 \pm 0.09	1.82 \pm 0.14			
	Pre-m	1.89 \pm 0.11	1.93 \pm 0.22			

NS: no significativo. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Control n = 3, 6 y 7, ST 35°C: shock térmico n=2, 6 y 9 para los estadios de post, inter y premuda, respectivamente. Valores de U mg⁻¹ de proteína soluble.

El efecto por hipertermia sobre la actividad de SOD en las diferentes muestras analizadas se puede observar con mayor claridad en la Fig. 15. La actividad de esta enzima en hemocitos del grupo sometido a estrés fue significativamente menor que en el control. Por otro lado, se puede distinguir que la actividad de SOD fue notablemente mayor en hemocitos que en plasma y hepatopáncreas, donde los índices de actividad enzimática fueron mínimos y no se vieron afectados por la condición de hipertermia.

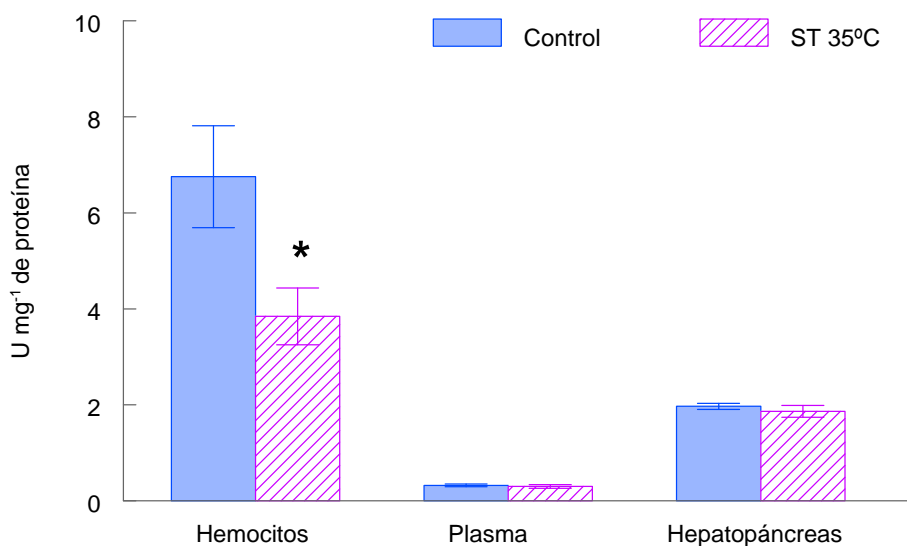


Fig. 15 Actividad de superóxido dismutasa en camarones sometidos a diferentes temperaturas (medias globales \pm error estándar). *Indica diferencia significativa respecto al control. Control n=16, ST 35°C: Shock térmico n= 17, 18 y 18 para hemocitos, plasma y hepatopáncreas, respectivamente.

7.2.5 Variables inmunológicas

Las medias individuales por condición de estrés y por estadio de muda de las variables inmunológicas analizadas, así como los resultados del ANOVA bifactorial correspondiente, se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Variables inmunológicas en hemolinfa (medias individuales \pm error estándar) en los distintos estadios de muda de *L. vannamei* sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M), se muestran en las 3 últimas columnas.

	Estadio	Control 28°C	ST 35°C	ET	M	ET x M
Anión Superóxido (A _{650nm} activado/ A _{650nm} basal)	Post-m	2.77	4.63 \pm 0.35			
	Inter-m	4.07 \pm 0.36	3.44 \pm 0.87	NS	NS	< 0.05
	Pre-m	6.33 \pm 0.77	3.01 \pm 0.39			
Tiempo de coagulación (seg)	Post-m	17.80 \pm 2.96	14.40 \pm 1.50			
	Inter-m	23.33 \pm 2.69	18.67 \pm 2.47	NS	NS	NS
	Pre-m	17.60 \pm 2.73	14.67 \pm 3.39			
Cuenta Total de Hemocitos (10 ⁶ ml ⁻¹)	Post-m	22.43	6.92 \pm 3.21			
	Inter-m	21.62 \pm 3.34	14.53 \pm 2.51	NS	NS	< 0.01
	Pre-m	13.68 \pm 1.38	26.39 \pm 4.91			

NS: no significativo. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Para TC: Control n = 5, 6 y 5, ST 35°C: shock térmico n=5, 6 y 6. Para las demás variables: Control n =1, 4 y 7, ST 35°C n=2, 4 y 7, en los estadios de post, inter y premuda, respectivamente.

Como se observa en esta tabla, se presentó un efecto significativo por interacción de la condición de estrés con el estadio de muda para la producción de anión superóxido y el conteo total de hemocitos. Por otro lado, el tiempo de coagulación no resultó afectado por la hipertermia, el estadio de muda o la interacción de ambos. Para mayor claridad, en la Fig. 16 se grafican las medias globales (por condición de estrés), indicando que a pesar de las variaciones observadas en los diferentes grupos, el factor de estrés por si solo no afectó significativamente los niveles de las variables inmunes analizadas.

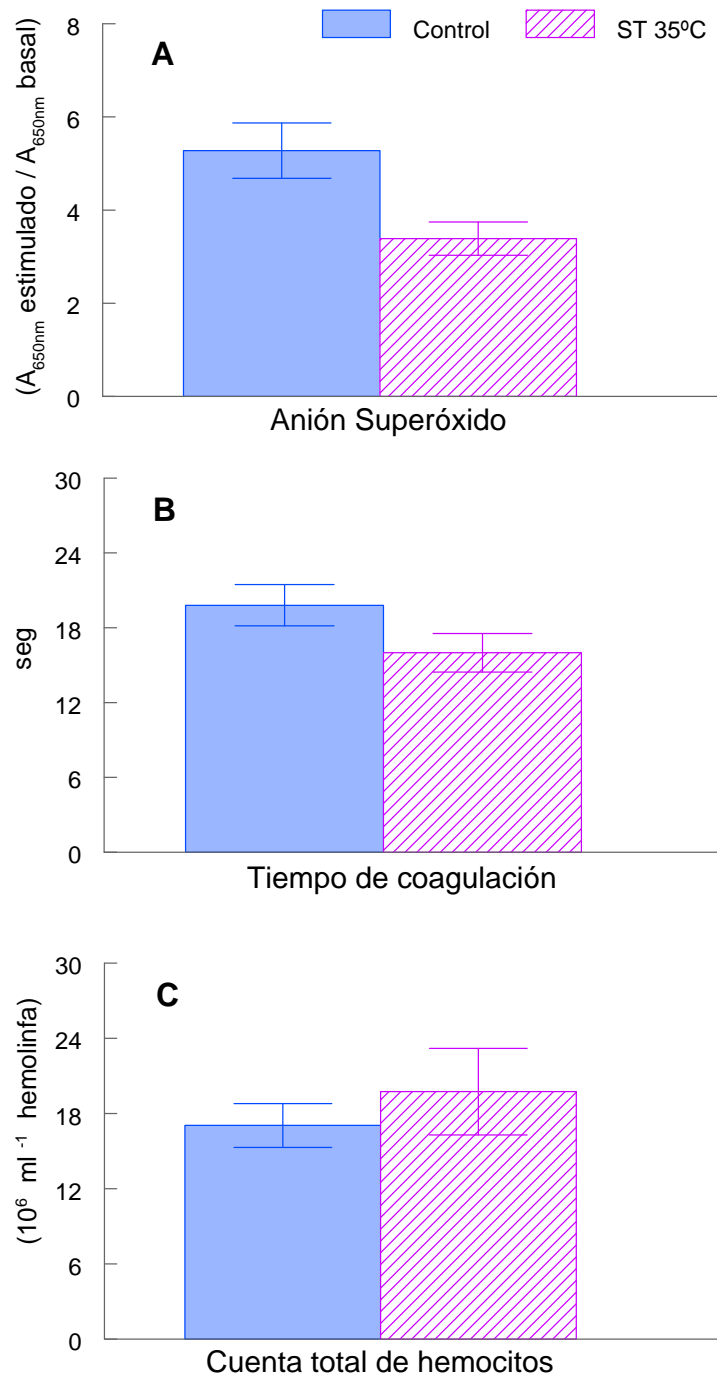


Fig. 16. Variables inmunes en camarones sometidos a diferentes temperaturas (medias globales \pm error estándar). Control n= 12, 16 y 12, ST 35°C: Shock térmico n=13, 17 y 13 para gráfica A, B y C, respectivamente.

La interacción entre hipertermia y muda se puede apreciar en la Fig. 17 con una disminución significativa de la producción de anión superóxido en el grupo de ST 35°C respecto al control, únicamente en estadio de premuda.

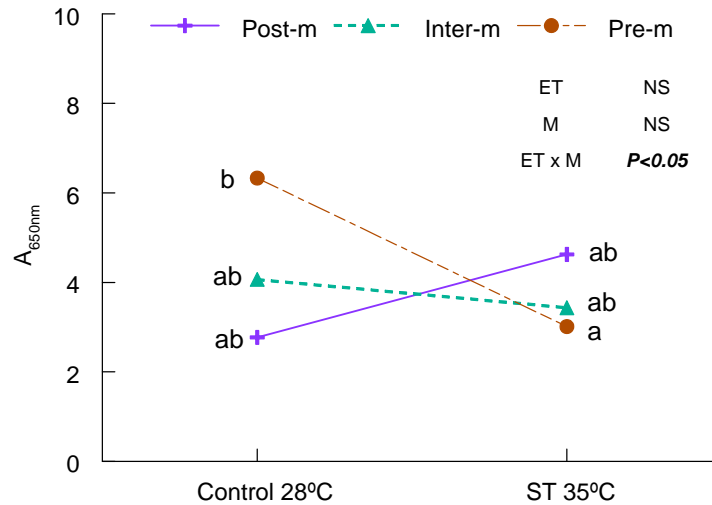


Fig. 17. Producción de anión superóxido en hemocitos (medias individuales) por estadios de muda en camarones sometidos a diferentes temperaturas. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M) están insertados en la gráfica. Control n = 1, 4 y 7, ST 35°C: shock térmico n=2, 4 y 7 para los estadios de post, Inter. y premuda, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias.

Finalmente, al interactuar la condición de estrés con el estadio de muda, la cuenta total de hemocitos de organismos sometidos a hipertermia, disminuye significativamente con respecto al control sólo en el estadio de postmuda (Fig. 18).

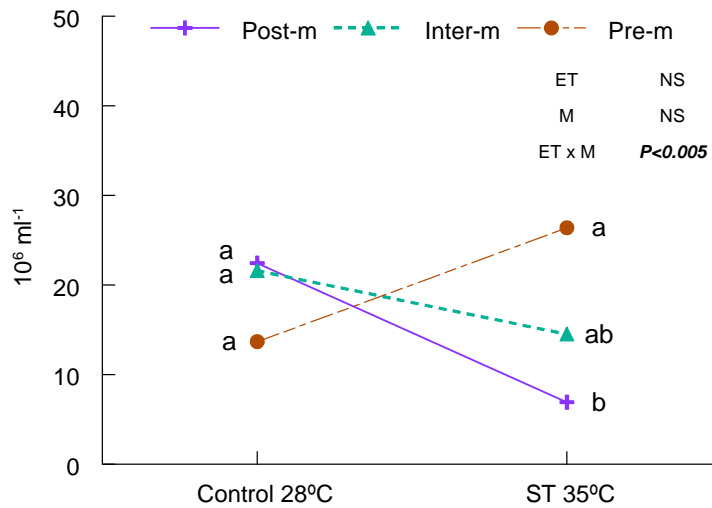


Fig. 18. Conteo total de hemocitos (medias individuales) por estadios de muda en camarones sometidos a diferentes temperaturas. Post-m: postmuda, Inter.-m: intermuda, Pre-m: premuda. Los resultados del ANOVA bifactorial (estrés térmico: ET x estadio de muda: M) se muestran en la gráfica. Control n = 1, 4 y 7, ST 35°C: shock térmico n=2, 4 y 7 para los estadios de post, Inter. y premuda, respectivamente. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre medias.

7.3. Tercer Bioensayo. Respuesta de la expresión génica por hipertermia a corto plazo: 28 - 32°C y 28 - 35°C.

7.3.1 Oligonucleótidos para la detección de Hsp70 y MnSOD

Al probar los oligos descritos en la Tabla 5 para amplificar por PCR el cDNA de las muestras preliminares de hepatopáncreas de camarón, se detectaron transcritos de MnSOD con ~890 pb, coincidiendo con el peso molecular esperado. Como control positivo, se utilizó DNA plasmídico con una secuencia correspondiente a la enzima MnSOD con el mismo peso molecular de 864 pb, lo que nos permitió verificar que la secuencia amplificada a partir del cDNA corresponde a la de nuestro interés. Por otro lado, de las dos combinaciones de Hsp 70 que se probaron, solamente dio respuesta positiva la de fwd1-rev1, obteniendo un fragmento de ~191 pb. Se utilizaron primers para GAPDH como control y un marcador de 100 pares de bases como referencia para el peso molecular (Fig. 19).

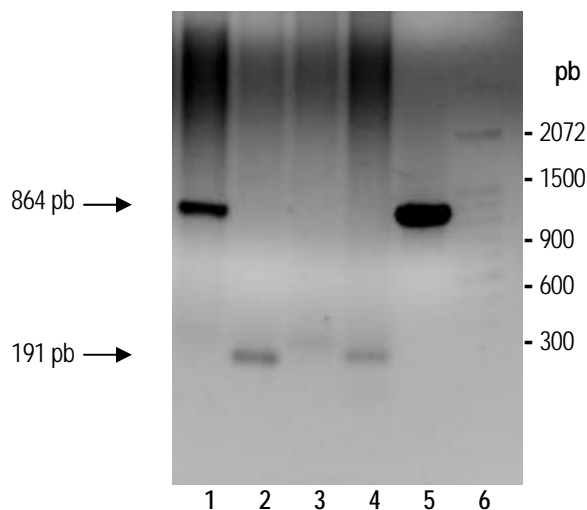


Fig. 19. Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de amplificación a partir de cDNA de hepatopáncreas de camarón correspondientes a: 1. MnSOD, 2. Hsp70 fwd1-rev1, 3. Hsp70 fwd1-rev2, 4. GAPDH, 5. Plásmido MnSOD, 6. Marcador de peso molecular de 100 pb.

7.3.2 Obtención y análisis de la secuencia parcial codificante para Hsp 70

Una vez que el fragmento de cDNA de hepatopáncreas de camarón correspondiente a la combinación fwd1-rev1 de Hsp70 fue extraído, purificado y clonado, se obtuvo la secuencia de 191 pb (Fig. 20). Se revisó que en esta secuencia de nucleótidos hubiera un 100% de complementariedad entre el segmento forward y el reverse. Posteriormente, se confrontó mediante análisis Blast con las bases de datos mundiales (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), con el fin de encontrar homologías de nuestra secuencia parcial con secuencias correspondientes a cualquier molécula en otros organismos. En la base de datos general, se encontró una homología con secuencias de Hsp70 de las siguientes especies; *Dicentrarchus labrax* (100%), *Oryzias latipes* (95%) y *Acanthopagrus schlegelii* (94%), entre otras (Tabla 17). Asimismo, al comparar esta secuencia con especies del

subphylum Crustacea, se encontró una homología del 79% respecto a Hsc70 en *Fenneropenaeus chinensis*, del 79% respecto a Hsp70 de *Penaeus monodon*, además de un 78% con *Portunus sanguinolentus* y *Litopenaeus vannamei* entre otros (Tabla 17). Es importante destacar que se observaron homología cercanas al 100% al comparar la secuencia deducida de aminoácidos con la de distintas especies de crustáceos contenidas en la base de datos del phylum Arthropoda (<http://ca.expasy.org/tools/blast/>) (Tabla 18). Los resultados de los análisis de blast nos permitieron confirmar que la secuencia obtenida, corresponde a Hsp70, por lo que se procedió a su registro en la base de datos Gen Bank de NCBI con número de acceso DQ813343, además de utilizarse como referencia para el diseño de las sondas Taqman.

1	<u>GACGTGTCCATCCTGACCAT</u> CGAAGACGGTATCTTTGAGGTCAAAGCCACGGCCGGAGACACTCACCTG
70	GGCGGGGAAGACTTTGACAACCGCATGGTCAACCACCTTTGTGGAGGAATTCAAGAGGAAACA CAAGAA
140	GGACATCAGCCAGAACAAGAGAGCCTTGAGGAGGCTGCGCACAGCTTGTGAGAG

Fig. 20 Secuencia parcial de nucleótidos de 191 pb, que codifica para Hsp70, obtenida a partir de cDNA de hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*. Las letras subrayadas comprenden las secuencias de los primers fwd1-rev1. Letras en *cursiva* corresponden a la secuencia de nucleótidos de la sonda taqman (58 pb).

Tabla 17. Comparación y porcentaje de homología entre la secuencia obtenida de Hsp 70 y la de otras especies en una base de datos general y dentro del subphylum Crustacea (GenBank).

No. de acceso	Descripción	Homología
AY423555.2	<i>Dicentrarchus labrax</i> HSP70 (HSP70) mRNA, complete cds	100%
AB436470.1	<i>Seriola quinqueradiata</i> HSP70-1 mRNA for stress protein HSP70, complete cds	95%
AF286875.1	<i>Oryzias latipes</i> HSP70-1 protein gene, complete cds	95%
AY762970.1	<i>Acanthopagrus schlegelii</i> HSP70 (HSP70) mRNA, complete cds	94%
DQ202280.1	<i>Fundulus heteroclitus macrolepidotus</i> heat shock protein 70 isoform 2 (hsp70) mRNA,	93%
FJ213839.1	<i>Oreochromis niloticus</i> heat shock protein 70 (Hsp70) mRNA, complete cds	93%
AY436787.1	<i>Rhabdosargus sarba</i> inducible heat shock protein 70 (hsp70) mRNA, complete cds	90%
AY035309.1	<i>Cyprinus carpio</i> heat shock protein HSP70 mRNA, partial cds	90%
Subphylum Crustacea		
EF472918.1	<i>Penaeus monodon</i> heat shock cognate 70 (HSC70) gene, promoter region and complete cds.	82%
AY748350.1	<i>Fenneropenaeus chinensis</i> heat shock protein 70 cognate mRNA, complete cds	80%
AF474375.1	<i>Penaeus monodon</i> heat shock protein 70 mRNA, complete cds	80%
EF091692.2	<i>Marsupenaeus japonicus</i> heat shock protein 70 (hsp70) mRNA, complete cds	80%
EF495128.1	<i>Litopenaeus vannamei</i> heat shock cognate 70 (HSC70) mRNA, complete cds	80%
AY645906.1	<i>Litopenaeus vannamei</i> heat shock protein 70 gene, complete cds	79%
EU514494.1	<i>Daphnia magna</i> heat shock protein 70 (hsp70) mRNA, complete	79%
AM410077.1	<i>Portunus sanguinolentus</i> hsp70 gene for heat shock protein 70 kDa	78%

Tabla 18. Comparación y porcentaje de homología entre la secuencia deducida de aminoácidos correspondientes a Hsp 70 con la de otras especies en una base de datos del phylum Arthropoda.

No. de acceso	Descripción
Q6S4R6	Heat shock protein 70 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
Identities = 57/63 (90%), Positives = 62/63 (98%)	
Query: 1	DVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRALRRLRT 60 DVSILTIEDGIFEVK+TAGDTHLGGEDFDNRMVNHF++EFKRK+KKD S+NKRALRRLRT
Sbjct: 206	DVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIQEFKRKYKKDPSENKRALRRLRT 265
Query: 61	ACE 63 ACE
Sbjct: 266	ACE 268
Q0Z8X0	Heat shock cognate 70 [hsc70] <i>Macrobrachium nipponense</i>
Identities = 57/63 (90%), Positives = 62/63 (98%)	
Query: 1	DVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRALRRLRT 60 DVSILTIEDGIFEVK+TAGDTHLGGEDFDNRMVNHF++EFKRK+KKD S+NKRALRRLRT
Sbjct: 206	DVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIQEFKRKYKKDPSENKRALRRLRT 265
Query: 61	ACE 63 ACE
Sbjct: 266	ACE 268
Q71KW5	Heat shock protein 70 <i>Penaeus monodon</i>
Identities = 56/63 (88%), Positives = 62/63 (98%)	
Query: 1	DVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRALRRLRT 60 DVSILTIEDGIFEVK+TAGDTHLGGEDFDNRMVNHF++EFKRK+KKD S+NKR+LRRLRT
Sbjct: 206	DVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIQEFKRKYKKDPSENKRSLRRLRT 265
Query: 61	ACE 63 ACE
Sbjct: 266	ACE 268
Q6GUA8	Heat shock protein 70 <i>Penaeus vannamei</i>
Identities = 56/63 (88%), Positives = 62/63 (98%)	
Query: 1	DVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRALRRLRT 60 DVSILTIEDGIFEVK+TAGDTHLGGEDFDNRMVNHF++EFKRK+KKD S+NKR+LRRLRT
Sbjct: 206	DVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIQEFKRKYKKDPSENKRSLRRLRT 265
Query: 61	ACE 63 ACE
Sbjct: 266	ACE 268
Q3L2Q2	Heat shock protein 70 cognate <i>Fenneropenaeus chinensis</i>
Identities = 56/63 (88%), Positives = 62/63 (98%)	
Query: 1	DVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRALRRLRT 60 DVSILTIEDGIFEVK+TAGDTHLGGEDFDNRMVNHF++EFKRK+KKD S+NKR+LRRLRT
Sbjct: 206	DVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIQEFKRKYKKDPSENKRSLRRLRT 265
Query: 61	ACE 63 ACE
Sbjct: 266	ACE 268
Q194W5	Heat shock protein 70 (Fragment) [hsp70] <i>Penaeus japonicus</i>
Identities = 56/63 (88%), Positives = 62/63 (98%)	
Query: 1	DVSILTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRALRRLRT 60 DVSILTIEDGIFEVK+TAGDTHLGGEDFDNRMVNHF++EFKRK+KKD S+NKR+LRRLRT
Sbjct: 206	DVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHFIQEFKRKYKKDPSENKRSLRRLRT 265
Query: 61	ACE 63 ACE
Sbjct: 266	ACE 268

7.3.3 Detección de Hsp70 y MnSOD de mRNA en muestras de camarón

A través de la amplificación del cDNA por PCR de punto final, se detectó la presencia de transcritos de Hsp70 y MnSOD en los diferentes tejidos de las muestras del bioensayo. Como se observa en la Fig. 21, también se verificó la calidad de los cDNA para proceder a la cuantificación de transcritos.

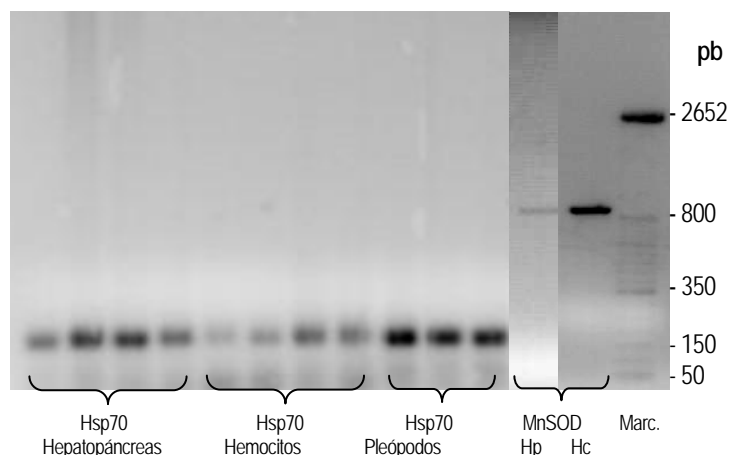


Fig. 21. Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de amplificación a partir del cDNA de las muestras de los distintos tejidos. Hp: hepatopáncreas, Hc: hemocitos. Marc: Marcador de peso molecular de 50 pb.

7.3.4 Validación de ensayos de PCR en tiempo real

Antes de realizar las curvas de rango dinámico con DNA plasmídico, se verificó a través de un PCR de punto final, que las secuencias de cDNA de hemocitos de camarón que codifican para 18s, Hsp70 y MnSOD, hubieran sido exitosamente ligadas al sitio de inserción del vector TOPO® (~205 pb), como se observa en la Fig. 22.

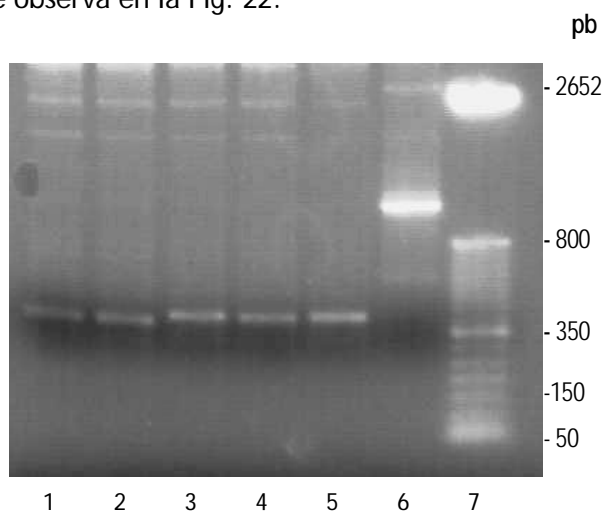


Fig. 22. Electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos de PCR con oligos M13 y DNA plasmídico clonado para la elaboración de las curvas estándar. 1 y 2: 18s (205 + 170 pb), 3, 4 y 5 Hsp70 (205 + 191 pb), 6: MnSOD (205 + 864 pb). 7: marcador de peso molecular de 50 pb.

Una vez verificada la calidad de los plásmidos, se amplificaron las 4 ó 5 diluciones seriadas de DNA por RT-PCR para determinar el rango dinámico de la reacción, y de esta forma establecer el ciclo al que cada una de las diluciones alcanza su umbral de detección (Ct) (Fig. 23). Asimismo, al graficar el Ct de cada dilución versus el log de la concentración, se obtuvo la pendiente de -3.43, -3.24 y -3.36 para 18s, Hsp70 y MnSOD respectivamente. Con estos valores se calculó la eficiencia de amplificación, misma que resultó mayor a 95% en todos los casos (Fig. 24).

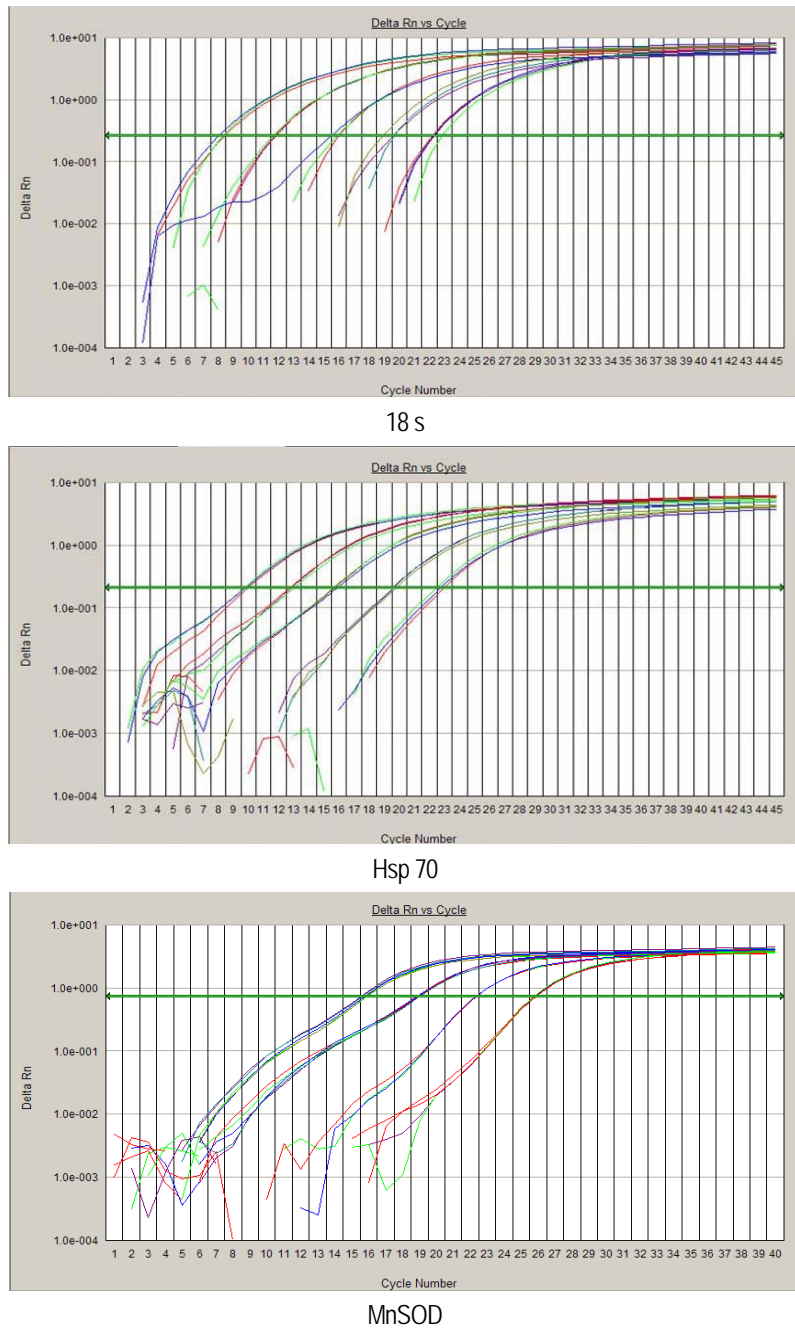


Fig. 23. Amplificación por RT-PCR de las diluciones seriadas de DNA plasmídico para los 3 distintos genes. Delta Rn versus el número de ciclos.

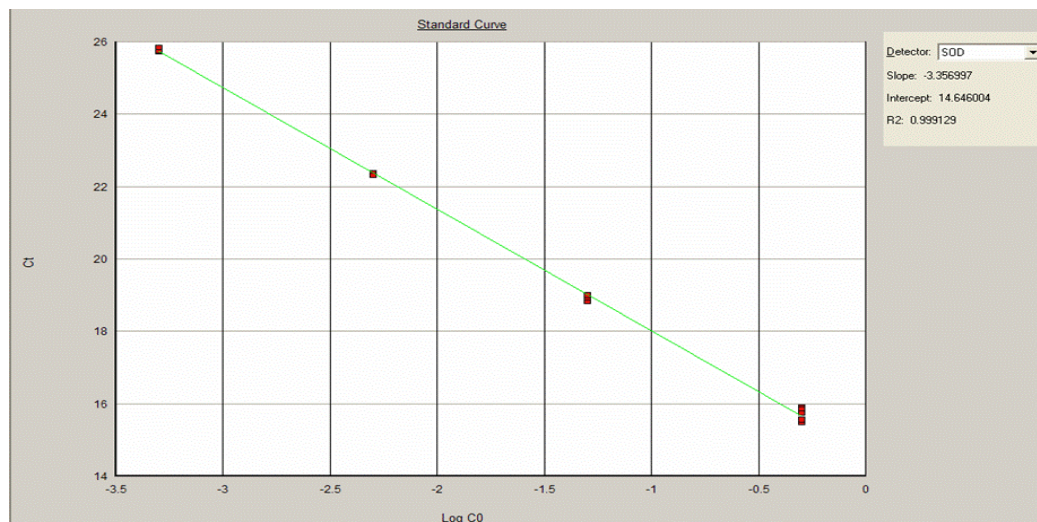
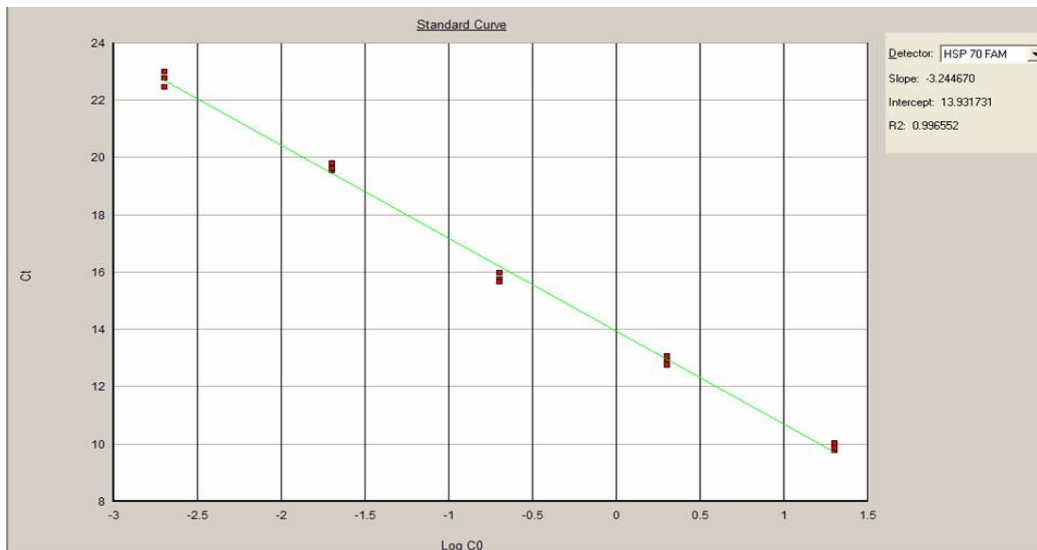
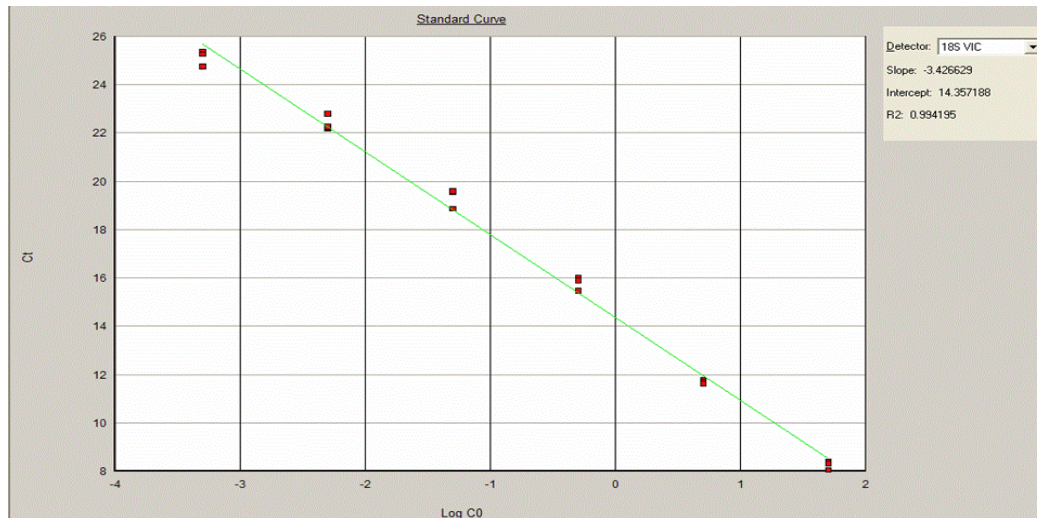
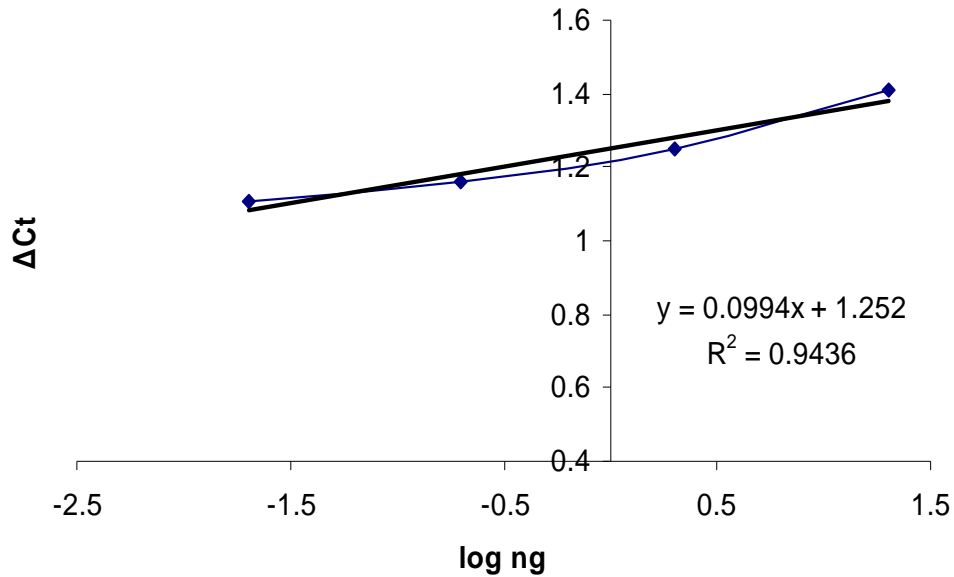
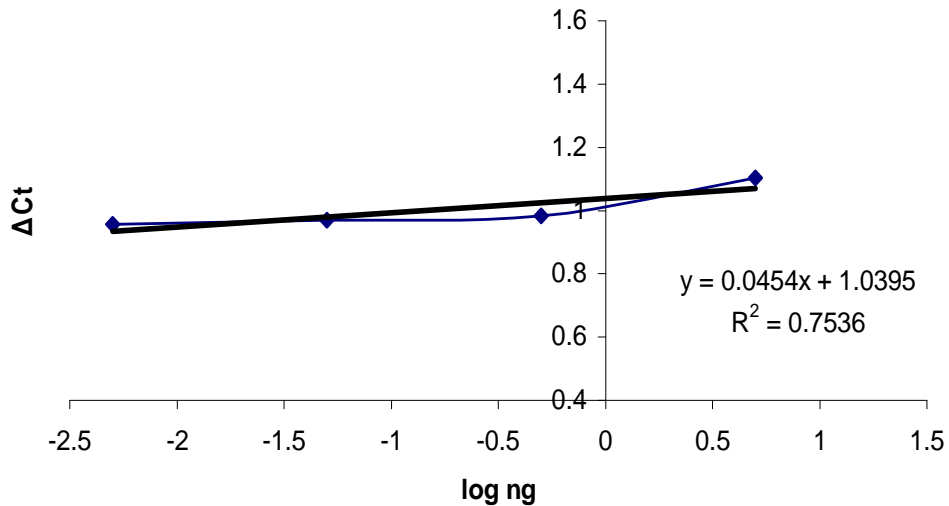


Fig. 24. Curvas estándar de 18s, Hsp 70 y MnSOD para evaluar la eficiencia de amplificación. Ct versus el logaritmo de la concentración de DNA.

Finalmente se comprobó que la eficiencia de amplificación del gen blanco y la del control endógeno es muy similar. Esto se observa en la Figura 25, al graficar el logaritmo de las concentraciones de DNA utilizadas para curva estándar versus el ΔCt ($Ct_{\text{gen blanco}} / Ct_{\text{control endógeno}}$) de cada gen, obteniendo una recta cuya pendiente resultó menor a 0.1, en ambos casos, lo cual indica que el método de cuantificación relativa ha quedado validado.



$\Delta Ct = Ct_{\text{Hsp}} / Ct_{18s}$



$\Delta Ct = Ct_{\text{MnSOD}} / Ct_{18s}$

Fig. 25. Eficiencia relativa entre el gen blanco (Hsp o MnSOD) y el gen de control endógeno (18s). Log en ng de la concentración de DNA presente en cada dilución de la curva estándar. La ecuación de la recta se encuentra inserta en cada gráfico, indicando el valor de la pendiente, que es menor a 0.1 en ambos casos.

7.3.5 Expresión génica: Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real

La expresión de RNAm de Hsp70 en hemocitos de camarón mostró un notable incremento en el grupo sometido a estrés térmico de 32°C (media: 1.992 unidades relativas), el cual casi duplica los niveles de expresión observados en el grupo control y ST35°C (medias: 1.097 y 1.021, respectivamente). Sin embargo, el incremento de expresión de Hsp70 en el grupo ST32°C no resultó significativo respecto a los demás grupos ($P=0.067$) (Fig. 26). Un efecto similar se observa en el caso de MnSOD, donde la expresión de RNAm en hemocitos incrementó en el grupo de ST32°C (media: 2.446), sin observarse una diferencia significativa respecto al control (media: 1.357) o al grupo de ST35°C (media: 1.963) (Fig. 26).

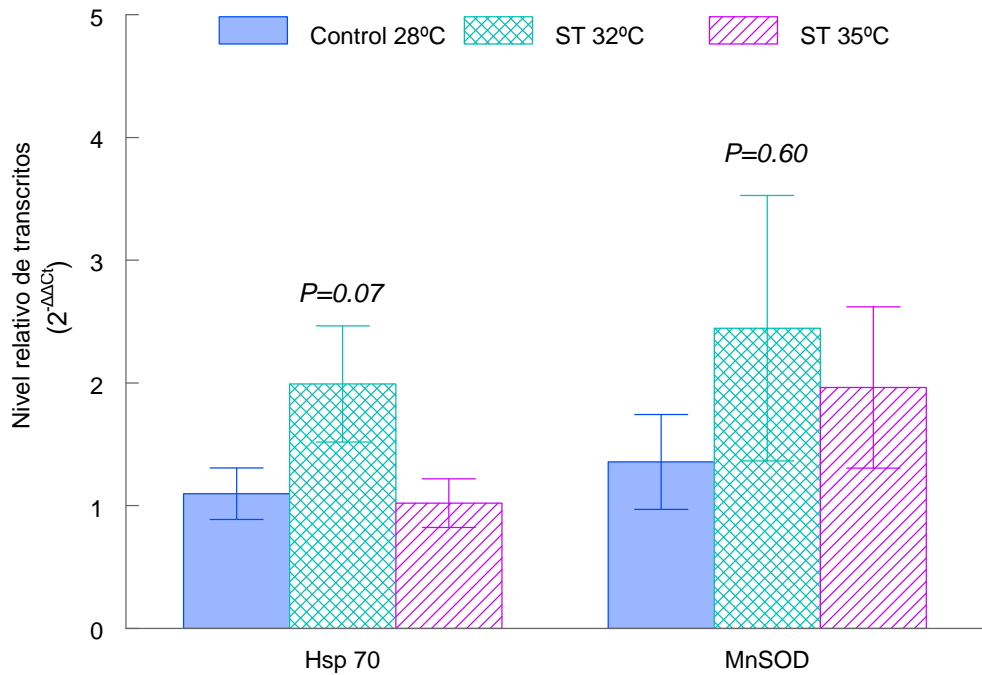


Fig. 26. Expresión génica. Niveles relativos de transcritos de RNAm para Hsp 70 y MnSOD en hemocitos (medias \pm error estándar) de camarones sometidos a diferentes temperaturas. ST: Shock térmico a 32 y 35°C. Los resultados del ANOVA unifactorial se muestran en la gráfica. NS: no significativo.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Temperatura y oxígeno disuelto

La temperatura del agua es una de las variables ambientales más importantes en los cultivos acuícolas, ya que determina la velocidad de las reacciones metabólicas de los organismos, que repercute a su vez en procesos biológicos críticos como el consumo de oxígeno, el desarrollo, crecimiento, reproducción, frecuencia del ciclo de muda y en general influye sobre el estado de salud y sobrevivencia del individuo (Kinne, 1970; Spees *et al.*, 2002a). Todos los organismos desempeñan estas funciones metabólicas de manera óptima en un determinado rango de temperatura, pero a medida que éste varía, dichas funciones son afectadas hasta que dejan de llevarse a cabo a temperaturas extremas. En el caso del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, el rango para un desarrollo satisfactorio oscila entre 25 y 28°C, aunque también crece de manera aceptable y con una alta sobrevivencia entre 20 y 30°C (Martínez-Córdova *et al.*, 1999; Ponce-Palafox *et al.*, 1997). Considerando esto, era de esperarse que las temperaturas de 32 y 35°C utilizadas en el presente trabajo, representaran una condición de estrés para los organismos en cultivo.

Un indicador de la termotolerancia en los organismos ectotermos como los crustáceos puede ser el máximo térmico crítico (CTmax). Esta medida representa la temperatura a la cual el individuo es incapaz de desarrollar efectivamente la actividad locomotora y por encima de la cual no es posible la supervivencia a largo plazo (Randall *et al.*, 1997; Hopkin *et al.*, 2006). El CTmax se relaciona con la inhibición de algunos procesos fisiológicos críticos. Por ejemplo, la mayoría de las funciones tisulares de muchos ectotermos se ven obstaculizadas por una disminución en la afinidad del pigmento respiratorio por el oxígeno en el límite superior de la temperatura corporal (Randall *et al.*, 1997). Se ha reportado un CTmax de 41.27°C para *Litopenaeus stylirostris* aclimatados a 28°C con una salinidad de 35‰ (Re *et al.*, 2005). Si bien no se ha reportado un CTmax para *L. vannamei*, está documentado que la temperatura preferencial de esta especie se encuentra entre 27.9 y 31.2°C dependiendo de las condiciones de aclimatación. Dentro de este rango, la temperatura preferencial resultó ser de 30.9°C en organismos previamente aclimatados a 28°C y 36‰ (Hernández *et al.*, 2006), que son condiciones de aclimatación similares a las utilizadas durante el presente estudio. Asimismo, Ponce-Palafox y colaboradores (1997) reportan que juveniles de *L. vannamei* presentan la mayor sobrevivencia entre 20 y 30°C en salinidades mayores a 20‰, con un crecimiento superior entre 25 y 35°C, aunque a ésta última temperatura la sobrevivencia a lo largo de 40 días, resultó afectada. Por el contrario, en el presente trabajo no se observó mortalidad de los camarones expuestos durante 3 horas a 35°C. Cabe destacar que al incrementar la temperatura a 37°C, en un experimento preliminar se observó mortalidad de los organismos una vez transcurrido el mismo lapso de tiempo. En base a estos resultados y a los estudios previamente mencionados, se

podría inferir que ambos experimentos fueron realizados por debajo del máximo térmico crítico. Sin embargo, es necesario evaluar si a la temperatura utilizada se ven afectados algunos procesos fisiológicos críticos, los cuales serán discutidos más adelante. Por lo pronto, se puede afirmar que el estrés por hipertermia a 32 y 35°C durante 3 horas de exposición usado en el presente trabajo, no afectó la sobrevivencia de los organismos, indicando que estas temperaturas fueron subletales.

Las temperaturas estables no son comunes en ambientes naturales ni en sistemas acuícolas. Por lo anterior muchos organismos han desarrollado adaptaciones bioquímicas que permiten amortiguar los efectos producidos en respuesta a las variaciones del medio ambiente (Spees *et al.*, 2002a). Estas variaciones pueden representar un factor de estrés, que conducen a una rápida cascada de respuestas moleculares y fisiológicas (Sánchez *et al.*, 2001). En la región del océano Pacífico en Baja California Sur, la temperatura media en los estanques puede variar de 17°C, incrementándose paulatinamente hasta 32°C, durante el ciclo de cultivo de marzo a noviembre (Portillo, comunicación personal).

En los estanques de cultivo, los camarones no están expuestos a un incremento tan abrupto de temperatura, pero las variaciones diarias oscilan de 22 a 26°C en primavera y de 31 a 33°C en verano, en un lapso mayor a 8 horas (registros de estanques de marea del Programa de Mejoramiento Genético, CIBNOR, La Paz). En el presente trabajo se aplicó un estrés térmico agudo, incrementando abruptamente la temperatura de 28 a 32 o 35°C en 1 hr, con el fin de asegurar una condición de estrés y poder evaluar la respuesta desde el nivel molecular y fisiológico, hasta la capacidad inmune en los camarones.

Aunado a los efectos fisiológicos de la temperatura en los organismos, ésta variable también tiene un efecto directo sobre otros factores ambientales, ya que al incrementarse favorece un aumento en la salinidad debido a la evaporación y una disminución en el oxígeno disuelto (OD) (Boyd, 1990).

La concentración de OD es uno de los parámetros de calidad del agua más importantes para un óptimo desarrollo y crecimiento en el cultivo de camarón. De tal manera que la temperatura actúa principalmente como un factor directo y controlador, mientras que el oxígeno es el principal factor limitante (Neill, 1989). Esto se debe fundamentalmente a que las reacciones bioquímicas al interior del organismo están controladas por los niveles de OD que es esencial para el metabolismo aerobio, donde participa en diferentes procesos oxidativos liberando la energía necesaria para el trabajo biológico (Prosser, 1991). La disminución en niveles de oxígeno reduce significativamente el consumo de alimento, la velocidad de crecimiento y la actividad general de camarones (Seidman y Lawrence, 1985; Ocampo *et al.*, 2000) además de incrementar la susceptibilidad a enfermedades (Seidman y Lawrence, 1985), mientras que al mantener niveles óptimos de oxígeno se obtienen mejores índices de producción (Boyd y Watten, 1989).

La concentración de OD en las unidades experimentales utilizadas para las pruebas de estrés térmico en todos los casos estuvo por debajo del nivel de saturación, incluyendo los

valores iniciales: 4.6 a 4.8 mg L⁻¹, 71 a 74% del nivel de saturación a 32 y 35°C respectivamente y 35‰ de salinidad (Boyd, 1990). Lo anterior indica cierta deficiencia en el sistema de aeración empleado en las unidades experimentales.

En el segundo experimento los niveles de oxígeno fueron ligeramente más bajos (en ~ 0.2 mg L⁻¹ de diferencia) que el experimento 1, lo cual indica que la deficiencia de los sistemas de aeración fue un poco más acentuada. Esto se explica tomando en cuenta que el segundo experimento se realizó en instalaciones diferentes. Sin embargo, otra posible fuente de variación en los niveles de oxígeno del grupo control al tiempo 180', podría ser por un aumento en el consumo de OD originado por el peso de los camarones, el cual es significativamente mayor que en el primer bioensayo (Anexo III).

La concentración de OD disminuyó significativamente con el aumento de temperatura tanto a 32 como a 35°C al cabo de 180 minutos con respecto al tiempo cero (Tabla 19). Esta disminución puede explicarse por un efecto fisicoquímico, considerando que la solubilidad del oxígeno en el agua disminuye a medida que aumenta la temperatura. Adicionalmente, se puede deber a un efecto biológico ejercido a lo largo del tiempo, donde un aumento en la temperatura produce un incremento en el consumo de oxígeno al acelerarse el metabolismo de los organismos (Boyd, 1990). En relación a esto, se ha reportado un incremento en el consumo de oxígeno en postlarvas de *L. vannamei* expuestas a temperaturas de 32°C y salinidad de 35 ‰ (Villareal *et al.*, 1994). De hecho, la disminución de OD fue mayor al aumentar la temperatura a 35°C en el segundo experimento. Sin embargo, también hay que considerar que las ya mencionadas diferencias en aeración y peso corporal de los camarones entre ambos experimentos, pudieron haber influido. En este sentido, se observa una mayor caída de los niveles de oxígeno en el grupo control del experimento 2 a comparación del grupo control del experimento 1 aunque en ningún caso la diferencia fue significativa con respecto al tiempo cero.

En resumen, en el presente trabajo, además del efecto controlado de un incremento de temperatura, tuvimos un efecto no controlado de disminución de oxígeno que al menos en el primer experimento si fue significativamente diferente al grupo control, posiblemente por una aireación suplementaria deficiente. Este factor externo, junto con la diferencia de peso en los organismos del segundo experimento, fue lo que probablemente no permitió apreciar el mismo efecto significativo en los niveles de OD por temperatura.

Tabla 19. Comparación de los efectos que resultaron significativos en ambas condiciones de hipertermia sobre las diferentes variables analizadas

	Experimento 1: 32°C	Experimento 2: 35°C
Oxígeno disuelto	↓ al t180' en ST	↓ al t180' en ST
Variables fisiológicas en hemolinfa		
• Glucosa		
Efecto por ET	↑ en ST	↓ en ST
Efecto por interacción ET x M	NS	↓ en Post-m e Inter-m de ST
• Proteínas		
Efecto por ET	↓ en ST	↓ en ST
Efecto por M	NS	↓ en Post-m vs Inter-m
• Hemocianina		
Efecto por ET	↓ en ST	NS
• Triglicéridos		
Efecto por M	↓ en Post-m	NS
• Presión osmótica		
Efecto por ET	NS	↑ en ST
Efecto por M	NS	↑ Pre-m
Variables fisiológicas en hepatopáncreas		
• Glucógeno		
Efecto por ET	-	↑ en ST
Variables inmunológicas		
• Actividad SOD en hemocitos		
Efecto por ET	-	↓ en ST
• Producción de anión superóxido		
Efecto por interacción ET x M	-	↓ en Pre-m de ST
• CTH		
Efecto por interacción ET x M	-	↓ en Post-m de ST

ST: shock térmico, ET: estrés térmico, M: estadio de muda, t180': valores de OD al finalizar la prueba, SOD: super óxido dismutasa, CTH: conteo total de hemocitos, NS: no significativo, -: no evaluado, Post-m: postmuda, Inter-m: intermuda, Pre-m: premuda, ↑ incrementa ↓ o disminuye significativamente.

Para poder inferir en que medida la disminución no deseada del oxígeno disuelto pudo haber influido, es necesario analizar el concepto de punto crítico de oxígeno (Pc). Biológicamente, el Pc permite diferenciar la capacidad reguladora de oxígeno que presenta el camarón en condiciones de normoxia y de conformador de oxígeno durante hipoxia (Bridges y Brand, 1980; Ocampo, 1994). Se ha documentado en diversos estudios el Pc de oxígeno para especies de camarones peneidos, tomando en cuenta distintos valores de temperatura y salinidad (Tabla 20). Asimismo, Seidman y Lawrence (1985) reportan niveles críticos de crecimiento para postlarvas de *P. vannamei* a 1.91 mg L⁻¹ de oxígeno.

Como podemos observar y a diferencia del trabajo de Martínez-Palacios *et al.* (1996), los valores de Pc reportados para *L. vannamei* están por abajo del nivel mínimo de oxígeno que observamos en el presente trabajo (3.92 mg L⁻¹ en t-180' de ST 35°C), por lo cual no esperaríamos un efecto sustancial, aunque se tomará en cuenta en la discusión particular de los efectos obtenidos.

Tabla 20. Punto crítico de oxígeno (Pc) a diferentes temperaturas y salinidades en camarones.

Pc de oxígeno (mg L ⁻¹)	Temperatura °C	Salinidad ‰	Estado de madurez	Especie	Referencia
1.1, 1.5, y 1.8	23, 27 y 31°C	35	preadultos	<i>P. californiensis</i>	Ocampo, 1994
0.91	20	25-40	postlarvas	<i>P. vannamei</i>	Villareal <i>et al.</i> , 1994
1.3	32				
5	28	35	juveniles (22 g)	<i>P. vannamei</i>	Martínez-Palacios <i>et al.</i> , 1996

Cabe aclarar que la discrepancia entre el trabajo de Martínez Palacios *et al.* (1996) y el resto de los estudios se puede deber a las condiciones experimentales dado que el Pc depende de una serie de factores como la propia temperatura, la salinidad, el grado de estrés o actividad física del organismo, el tamaño, el estadio del ciclo de vida, además del estado fisiológico del animal. A partir de esto, se han encontrado diferencias incluso entre organismos de la misma especie, en la capacidad de mantener una independencia entre el consumo de oxígeno y la tensión ambiental de oxígeno bajo condiciones de hipoxia (Bridges y Brand, 1980). Por esta razón, no descartamos un posible efecto del OD en nuestro trabajo dado que algunos de estos factores pudieron haber implicado el estar por debajo del Pc.

8.2 Respuesta fisiológica

Los cambios metabólicos como respuesta a agentes de estrés tienen la finalidad de producir la energía, necesaria para reestablecer la condición de equilibrio que ha sido alterada. Dentro de los indicadores clásicos de estrés en crustáceos, se encuentran las variaciones en los niveles de glucosa, lactato y la capacidad osmorreguladora en hemolinfa entre muchas otras variables que han sido analizadas con el fin de monitorear el estado de salud y el efecto del estrés en los camarones ante diversos estímulos. De manera general, se ha establecido que los sustratos orgánicos, en condiciones de ayuno prolongado son movilizados progresivamente, iniciando con carbohidratos, seguido de los lípidos y posteriormente las proteínas, que son movilizadas más lentamente (Cuzon y Barbieri, 1980). Sin embargo, diversos estudios en metabolismo de crustáceos han mostrado una alta variabilidad en la movilización de reservas, lo cual hace difícil asumir un perfil metabólico estándar (Sánchez-Paz *et al.*, 2007). En el presente trabajo, las variaciones en hemolinfa y/o tejidos de la concentración de glucosa, glucógeno, proteínas y presión osmótica pueden dar una indicación de cómo están siendo utilizados los combustibles metabólicos para compensar la condición de estrés por hipertermia a corto plazo.

8.2.1 Lactato

El lactato es considerado un indicador de estrés a consecuencia de un metabolismo anaerobio forzado (Paterson, 1993). Se ha reportado en numerosos trabajos un incremento en los niveles de lactato en hemolinfa debido a diversos factores de estrés, como retar camarones

con la bacteria *Vibrio alginolyticus* (Hsieh *et al.*, 2008), al someter organismos a condiciones de hipoxia a corto plazo, además del efecto combinado de hipoxia con altas concentraciones de amonio (Mugnier *et al.*, 2008), por hipoxia aguda y crónica (Racotta *et al.*, 2002) y por incremento de la actividad inducida por persecución (Racotta *et al.*, 2003), entre otros. Por el contrario, se ha documentado que el lactato en hemolinfa disminuye al aclimatar a *L. setiferus* a 27°C durante 7 días, a diferencia de los aclimatados a 31°C donde hubo un incremento y se argumentó que en el primer caso, esta disminución representaba una reducción de estrés por encontrarse en las condiciones adecuadas (Sánchez *et al.*, 2001).

A diferencia de lo reportado, en el presente trabajo no se observó ninguna variación significativa en la concentración de lactato en hemolinfa en la prueba de estrés a 32°C. Esto puede deberse a que el lactato no es un indicador suficientemente sensible a la condición de estrés térmico agudo que se utilizó en el presente trabajo. En este sentido, Racotta y Palacios (1998) reportan que a pesar de encontrar un pronunciado y rápido incremento en los índices de lactato en hemolinfa por inyección con serotonina, no se presentó un incremento significativo de esta variable al extraer muestras repetidamente de *L. vannamei* y se sugirió que los niveles circulantes de glucosa son un indicador de estrés más sensible que el lactato (Racotta y Palacios, 1998).

Al igual que en el primer bioensayo, en el experimento de 35°C no se encontraron diferencias significativas en los niveles de lactato en hemolinfa ni en tejidos. En relación a esto, se ha reportado que bajo condiciones de exposición continua con algunos estresores, la concentración de lactato puede llegar a ser mayor que la capacidad que tiene el organismo para su oxidación, produciendo acumulación de este metabolito principalmente en músculo (Paterson, 1993). Pérez-Rostro *et al.* (2004) encontraron acumulación de lactato en músculo y en hepatopáncreas bajo condiciones de hipoxia aguda. En el presente trabajo, se observó una ligera acumulación de lactato en músculo de organismos en postmuda del grupo ST 35°C. Sin embargo es necesario analizar esta variable en un mayor número de organismos por estadio de muda para poder sugerir una acumulación de ésta como producto final del metabolismo anaerobio.

El no haber encontrado en ambos bioensayos variaciones significativas en los niveles de lactato en hemolinfa o tejidos, puede deberse principalmente a dos causas. En primer lugar, como ya se mencionó anteriormente, que el lactato no es un indicador suficientemente sensible de estrés agudo por hipertermia. En segundo lugar, se puede sugerir que las concentraciones de OD en ambos experimentos no fueron lo suficientemente bajas para activar el metabolismo anaerobio en los organismos, dado que en general, no se encontró incremento en los niveles de lactato en hemolinfa ni en tejidos. Es necesario retomar aquí el concepto de P_c dado que por debajo de éste, el consumo normal de oxígeno no podrá ser mantenido por el organismo, presentándose una activación del metabolismo anaerobio (Rosas *et al.*, 1997). Así, en condiciones de hipoxia la energía tendrá que ser parcial o totalmente obtenida a través de glicólisis anaerobia, resultando en un incremento de lactato como producto final, tal como se ha

observado para *L. vannamei* pero en condiciones de hipoxia de 2 a 2.6 mg L⁻¹ durante 2 días o 2 semanas (Racotta *et al.*, 2002) o bien de 0.4 mg L⁻¹ durante 1 hora (Pérez-Rostro *et al.*, 2004) además de 1.5 mg L⁻¹ por 24 horas (Mugnier *et al.*, 2008). Por otro lado, la importancia de un nivel muy bajo de oxígeno para activar el metabolismo anaerobio también ha sido evidenciado por Hagerman *et al.* (1990), quienes observaron un incremento en la concentración de lactato en hemolinfa de langostas *Nepros norvegicus* expuestas por 2 días a niveles de saturación de oxígeno del 10%, no así a saturaciones del 20-50% de oxígeno. Aunado a esto, Racotta y Hernández (2000) tampoco observan incremento en los índices de lactato en hemolinfa ni en tejidos de *L. vannamei* sometidos a altas concentraciones de amonio, aún considerando que se presentó un aumento en el consumo de oxígeno y que se llegaron a tener niveles cercanos a 3 mg L⁻¹ de oxígeno disuelto. A partir de esto, podemos inferir que no se presentó una activación generalizada del metabolismo anaerobio, lo cual parece indicar efectivamente que el P_c de juveniles en nuestras condiciones experimentales, parece ser inferior a 3.9 mg L⁻¹, en contraste con lo reportado por Martínez-Palacios *et al.* (1996). Por lo anterior, las alteraciones en las variables analizadas, podrían deberse más al estrés por hipertermia y no tanto a las condiciones del oxígeno disuelto en ambos bioensayos.

En resumen, la falta de variación en los niveles de lactato en ambas pruebas de estrés sugiere lo siguiente:

- El metabolismo anaerobio no fue activado, aún tomando en cuenta las condiciones de OD.
- El lactato es un indicador poco sensible a estrés agudo por hipertermia.
- El estadio de muda por sí mismo o en interacción con la condición de estrés no contribuyó en activar el metabolismo anaerobio de los camarones.

8.2.2 Glucosa y glucógeno

La glucosa representa la principal fuente de carbohidratos circulantes y proviene de tres fuentes: por absorción intestinal, por hidrólisis de glucógeno (glucogenólisis) y por su síntesis a partir de lactato, aminoácidos y glicerol (gluconeogénesis) (Stryer, 1995). Los niveles basales de glucosa en hemolinfa observados en el presente trabajo oscilan de 19.47 a 27.24 mg dl⁻¹ y de 20.32 a 29.34 mg dl⁻¹ en los grupos de estrés. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado para diversas especies de camarones peneidos, incluyendo *L. vannamei*, en condiciones basales o expuesto a algún factor de estrés (ver Tabla 21).

En general, se ha establecido que la hiperglicemia de camarones peneidos es un componente común de la respuesta de estrés a corto plazo (minutos a horas) en situaciones de hipoxia (Hall y van Ham, 1998), muestreos repetitivos de hemolinfa (Racotta y Palacios, 1998), exposición a altas concentraciones de amonio (Mugnier y Justou, 2004), infección con *V. alginolictus* (Hsieh *et al.*, 2008), entre otros. En algunas condiciones de estrés a largo plazo (días a semanas), también se ha observado un incremento de la glucosa en respuesta a hipoxia moderada (Racotta *et al.*, 2002) y manipulación crónica (Mercier *et al.*, 2006). Sin embargo, en

otras situaciones de estrés a largo plazo se observa un decremento en los niveles de glucosa ante perturbaciones como hipoxia moderada (Hagerman *et al.*, 1990), aclimatación a condiciones de laboratorio durante 7 días a 31°C (Sánchez *et al.*, 2001), hipertermia a 33°C durante 5 días (Pascual *et al.*, 2003) y actividad reproductiva continua durante 2 meses (Pérez-Jar *et al.*, 2006).

Tabla 21. Niveles de glucosa en hemolinfa en condiciones basales y por diversos factores de estrés en distintas especies de camarón.

Niveles de glucosa en hemolinfa (mg dl ⁻¹)		Factor de estrés	Estadio y/o peso	Especie	Referencias
basales	post estrés				
~ 15	~ 55*	Manipulación experimental	juveniles		Racotta y Palacios, 1998
~ 14	~ 56*	Inyección de serotonina	(6 - 8 g)		
12.9 ± 7.2	57.0 ± 30.2*	Hipoxia por 3 días	juveniles		Racotta <i>et al.</i> , 2002
	45.3 ± 19.7*	Hipoxia por 2 semanas	(7 - 9 g)		
~ 50	~ 20*	Ayuno prolongado (previa dieta: proteína 5%)	juveniles		Pascual <i>et al.</i> , 2006
~ 52	~ 27*	Ayuno prolongado (previa dieta: proteína 40%)	(8.43 - 8.97 g)	<i>L. vannamei</i>	
16.9 ± 2.8	17.1 ± 2.0	Manipulación crónica (estanques externos)	juveniles		Mercier <i>et al.</i> , 2006
8.5 ± 3.6	12.1 ± 1.3*	Manipulación crónica (estanques internos)	(8 - 12 g)		
~ 21	~ 29	36 días después del reto con <i>Vibrio alginolyticus</i>	juveniles		Hsieh <i>et al.</i> , 2008
~ 10	~ 12	72 días después del reto con <i>Vibrio alginolyticus</i>	(11.19 - 13.19 g)		
~ 14	~ 13	Aclimatación a 27 °C	31.8 - 33.2		Sanchez <i>et al.</i> , 2001
~ 12	~ 8*	Aclimatación a 31 °C		<i>L. setiferus</i>	
~ 21	~ 7.5*	Hipertermia (33°C) por 5 días	26.96 - 28.52		Pascual <i>et al.</i> , 2003
	~ 19	Hipertermia (33°C) por 8 días	g		
C: ~ 32 D ₀ : ~ 31 D ₁ : ~ 33 D ₂ : ~ 36	C: ~ 48* D ₀ : ~ 46* D ₁ : ~ 45 D ₂ : ~ 50	Altas concentraciones de amonio	subadultos		Mugnier y Justou, 2004
	C: ~ 49 D ₂ : ~ 70*	Altas concentraciones de amonio	(19.4 - 23.4 g)	<i>L. stylirostris</i>	
C: ~ 49 D ₂ : ~ 50	C: ~ 44 D ₂ : ~ 69	Hipoxia	juveniles		Mugnier <i>et al.</i> , 2008
	C: ~ 46 D ₂ : ~ 49	Amonio + hipoxia	(5.3 - 7.3 g)		
32.2 ± 3	22.7 ± 4*	Cambio hiposalino (de 15 a 0 ‰)	adultos		Joseph y Philip, 2007
	38.5 ± 6*	Cambio hipersalino (de 15 a 35 ‰)	(17.84 - 21.86)	<i>P. monodon</i>	

C: intermuda, D: premuda. Los datos aproximados (-) fueron tomados a partir de las gráficas de los trabajos citados, por lo que no se puede saber con exactitud su valor. * Diferencia significativa respecto a su control experimental.

En el primer bioensayo de 32°C, se observó un incremento significativo en la concentración de glucosa en hemolinfa del grupo sometido a estrés (Tabla 19). Esto concuerda con lo comúnmente reportado para condiciones de estrés a corto plazo. Aunado a esto, la hipertemia es una condición de estrés que acelera la mayoría de los procesos fisiológicos, lo cual representa un factor más para esperar un aumento en la demanda de combustibles como la glucosa, que permita reestablecer el equilibrio metabólico (Joseph y Philip, 2007). Por lo general, se ha aceptado que hay un incremento de glucosa en hemolinfa proveniente de la movilización de glucógeno almacenado en músculo y hepatopáncreas con el fin de satisfacer la demanda metabólica de sustrato en estos tejidos y además para proveer de glucosa a otros tejidos con una alta demanda de energía, como el corazón y sistema nervioso (Van Aardt, 1988). El glucógeno en tejidos no fue analizado en este bioensayo, pero el aumento en la glucosa puede deberse además de la movilización de glucógeno en tejidos, al uso de otros combustibles metabólicos para la síntesis de glucosa, como las proteínas totales cuyos niveles en hemolinfa disminuyeron, significativamente. No se observaron variaciones significativas en los niveles de glucosa circulante por el ciclo de muda o por el efecto combinado con hipertermia, al igual que lo reportado por Mugnier y Justou (2004) al someter a *L. stylirostris* a altas concentraciones de amonio como factor externo único de estrés.

Por el contrario, en la prueba de 28 a 35°C encontramos una tendencia opuesta, ya que los índices de glucosa en hemolinfa disminuyeron en el grupo de shock térmico (Tabla 19). Esta respuesta de hipoglicemia es similar a la observada en trabajos de estrés a largo plazo. Pascual y colaboradores (2003), al someter camarón blanco a temperaturas de 33°C, encontraron que el índice de glucosa en hemolinfa disminuyó en un 66.7% al quinto día, comparado con los primeros cuatro días del bioensayo. Esto podría tomarse como evidencia de que la tolerancia en camarón a 33°C tiene un límite fisiológico, ya que la glucosa circulante fue utilizada para compensar la condición de estrés, aunque solo a partir del día cinco. En contraste, en el presente trabajo a un incremento mayor de temperatura (35°C) y al cabo de tres horas, también se observó una disminución significativa en los niveles de glucosa, aunque a menor grado dado que solo disminuyó en un 25.4% respecto a su control. Cabe mencionar que se utilizó un periodo de ayuno (de 15-18 hrs) ligeramente mayor a las 12 horas utilizadas en el trabajo citado anteriormente (Pascual *et al.*, 2003). Sin embargo, podemos considerar que el tiempo de ayuno influyó en forma mínima, o no afectó los niveles de glucosa tomando en cuenta que en el primer bioensayo no se observó una disminución, por el contrario la glucosa en hemolinfa aumentó.

Además del tiempo de exposición a una determinada situación de estrés, se han reportado otras situaciones en las cuales se puede tener una respuesta hiper- o hipoglucémica ante un mismo agente estresor, dependiendo de cómo se aplica dicho estresor. Joseph y Philip (2007) observaron un incremento de esta variable en *P. monodon* ante un cambio de salinidad de 15 a 35‰ en un lapso de 7 horas. Por el contrario, al someter los organismos a 0‰ de salinidad, la glucosa disminuyó significativamente respecto a su control. Lo anterior podría indicar que el costo fisiológico de osmorregular en un ambiente hiposalino es mayor, ya que la

disminución de glucosa como combustible metabólico pudo deberse a su utilización para trabajo osmótico. De la misma manera, en el presente trabajo la condición de estrés por hipertermia de 35°C implicó una mayor demanda metabólica viéndose disminuidos los niveles de glucosa, no así a 32°C donde el requerimiento energético aparentemente fue menor. Un efecto similar lo obtienen Mugnier y colaboradores (2008) al someter a juveniles de *L. stylirostris* a estrés de corto plazo por amonio e hipoxia en pruebas separadas, donde observaron un incremento significativo en los niveles de glucosa en organismos en etapa de premuda. Sin embargo, al intensificar las condiciones de estrés y combinando ambos factores en una misma prueba, la glucosa ya no varía con respecto al control, sugiriendo que la glucosa movilizada a la hemolinfa ya está siendo utilizada en vista de que la situación de estrés es acentuada frente a dos estresores. El incremento en los niveles de glucosa observado en el presente trabajo a 32°C y su disminución a 35°C, junto con los resultados obtenidos en los trabajos recién mencionados indican que la intensidad o la condición extrema de un factor de estrés, influyen en primer lugar en la movilización de las reservas para poner a disponibilidad la glucosa como combustible circulante seguido de una utilización de esta misma cuando su demanda se acentúa.

Una vez aclarado que el decremento en niveles de glucosa circulante ha sido documentado en varios trabajos como una respuesta ante condiciones ambientales extremas a corto plazo y no exclusiva de respuesta por estrés a largo plazo, es necesario entender el mecanismo de esta respuesta. En este sentido, se propone que la alta demanda energética bajo condiciones extremas de estrés promueve que el consumo de glucosa circulante se acelere a tal grado, que sobre pase la movilización a partir de reservas de glucógeno en hepatopáncreas, por lo que los niveles de glucosa en hemolinfa se ven disminuidos. Sin embargo y contrario a lo esperado, en el presente trabajo se observan mayores niveles de glucógeno en hepatopáncreas en el grupo de shock térmico de 35°C. Un resultado similar fue obtenido por Hernández-Herrera (1998), quien también reporta un incremento significativo en los niveles de glucógeno en hepatopáncreas de camarones sometidos a altas concentraciones de amonio por 20 horas, y sugiere que esto se debe a una baja en la tasa de utilización de dicho compuesto por la ineficiencia energética relativa que presentan los carbohidratos en comparación con otros combustibles metabólicos como las proteínas. Tal argumento permite relacionar el incremento en concentración de glucógeno con el decremento de proteínas totales en hemolinfa, por la utilización de ésta variable como fuente alterna de energía, lo que tendría como efecto disminuir el uso de glucógeno o bien, la síntesis de éste y su posterior almacenamiento en hepatopáncreas. Esto podría ser factible tomando en cuenta que la glucogénesis a corto plazo ha sido descrita en mamíferos sometidos a condiciones de estrés agudo como es el ejercicio físico, donde la glucosa-6-fosfato formada en el hígado puede ser utilizada para sintetizar glucógeno en ese tejido, o alternativamente puede ser hidrolizada a glucosa para entrar al torrente sanguíneo y satisfacer la demanda de esta variable en músculo (Hill, 1976).

Respecto al ciclo de muda, se encontró que únicamente en la prueba de 35°C los niveles de glucosa en hemolinfa se vieron afectados por la interacción entre estadio y la temperatura.

Los niveles basales de glucosa en premuda son los más bajos en relación con los demás estadios, lo cual puede explicarse considerando que el ciclo de muda es un proceso que demanda alta cantidad de energía (Sánchez-Paz *et al.*, 2007) y probablemente la glucosa fue utilizada como combustible metabólico para satisfacer esa demanda energética. Con excepción de la premuda los niveles de glucosa en hemolinfa resultaron mayores en el resto de los estadios, debido posiblemente a que después de un breve periodo de ayuno durante la postmuda temprana (A), la alimentación es reanudada en el organismo a partir de la postmuda tardía (B), cuando el exoesqueleto es suficientemente rígido para soportar el peso y manejo del alimento (Sánchez-Paz *et al.*, 2007), restableciendo de esta forma, los niveles de glucosa circulante. Una vez que los organismos fueron sometidos a hipertermia de 35°C la concentración de esta variable disminuye significativamente en intermuda y postmuda del grupo de estrés (Tabla 19), indicando que los niveles de glucosa acumulados en condiciones basales ahora son consumidos por el organismo para compensar la condición de estrés. Por el contrario, los niveles de glucosa circulante en premuda no presentaron variaciones significativas por efecto del shock térmico, dado que los niveles de por sí ya eran bajos en el grupo control. De manera similar, se ha reportado que los niveles de glucosa en hemolinfa de camarones en premuda tardía (D₂) se mantienen cerca de sus valores basales, por el efecto combinado de hipoxia y amonio (Mugnier *et al.*, 2008). Aunque en dicho trabajo no se muestrearon organismos en etapa de postmuda para el análisis de glucosa en hemolinfa, la alta mortalidad observada, exceptuando la intermuda, indica que en el resto de las etapas el camarón se encuentra más susceptible a los diversos factores ambientales (Le Moullac *et al.*, 1997; Mugnier *et al.*, 2008).

De las variables bioquímicas analizadas en el presente trabajo, la glucosa fue la única que presentó un efecto significativo por interacción entre hipertermia y estadio de muda, lo que confirma que es un sensible indicador de estrés. Sin embargo, debido a que el estrés por hipertermia afectó de manera similar a los diferentes estadios de muda en las demás variables fisiológicas, sería conveniente analizar la respuesta en un número más grande de organismos para poder observar de manera más precisa cuál es el estadio de muda más susceptible a estrés por hipertermia.

En base a los resultados obtenidos y a las referencias citadas sobre las variaciones de glucosa y glucógeno en respuesta al estrés se sugiere:

- El factor que determina la variación en los niveles de glucosa es la intensidad del agente de estrés, que puede estar determinada por 3 causas: tiempo de exposición, condición extrema o fuerza del estresor y el efecto combinado de más de un estresor.
- Cuando las condiciones de estrés son moderadas, como a 32°C, generalmente se presenta hiperglicemia pero en condiciones más extremas, como a 35°C, se observa hipoglicemia.
- A 32°C el incremento de glucosa en hemolinfa proviene probablemente de las reservas de glucógeno en hepatopáncreas o de fuentes alternas como proteínas circulantes. Esta

respuesta se da ante un incremento en la demanda de combustible metabólico por efecto de hipertermia, para compensar la condición de estrés.

- A 35°C la disminución de glucosa en hemolinfa y el incremento de glucógeno en hepatopáncreas por efecto de estrés, se puede explicar por una tasa de consumo de glucosa circulante sin la producción de glucosa a partir del glucógeno de hepatopáncreas.
- El estrés por hipertermia a 35°C y el ciclo de muda tienen un efecto combinado sobre los niveles de glucosa en hemolinfa, disminuyendo significativamente en postmuda e intermuda pero no en premuda.
- La glucosa es un indicador de estrés muy sensible ya que varía diferencialmente ante la intensidad del estrés por hipertermia y frente a los distintos estadios de muda.

La hiperglicemia puede ser un indicador de la estimulación de otro mecanismo de compensación, ya que se ha encontrado que la glucosa exhibe una correlación positiva con la mayoría de otras variables metabólicas (Joseph y Philip, 2007), como son las proteínas, lípidos y presión osmótica, las cuales serán discutidas más adelante.

8.2.3 Lípidos totales y triglicéridos

Los lípidos son una fuente importante de energía en camarones. Además de estar involucrados en diversos procesos esenciales de su crecimiento, muda y reproducción, los lípidos intervienen en el mantenimiento de estructuras, tejidos celulares (Yepiz-Plascencia *et al.*, 2000), funcionan como vehículo de vitaminas liposolubles (como la A, D, E, K) y son precursores de algunas hormonas (Berg *et al.*, 2002). Los ácidos grasos son estructuras lipídicas básicas, a partir de las cuales se forman estructuras más complejas como fosfolípidos, que componen a las membranas celulares. Además, los ácidos grasos son moléculas combustibles extraordinariamente eficientes para almacenar energía en forma de triacilgliceroles (también llamados triglicéridos) (Berg *et al.*, 2002), que son transportados en el torrente sanguíneo a través de lipoproteínas de baja densidad (Chang y O'Connor, 1983). La concentración de triglicéridos mostró una ligera tendencia a incrementarse en hemolinfa de camarones sometidos a hipertermia de 32 y 35°C, aunque en ambos casos estas variaciones no fueron significativas. De forma contraria, los triglicéridos y los lípidos totales muestran una tendencia a disminuir en hepatopáncreas de camarones expuestos a shock térmico de 35°C. Esto podría sugerir que al agotarse los niveles circulantes de glucosa y proteínas, empezaron a mobilizarse las reservas de triglicéridos en hepatopáncreas hacia hemolinfa con el fin de incrementar los niveles circulantes para satisfacer la demanda energética debido al estrés. Se ha propuesto que en crustáceos los triglicéridos son catabolizados preferencialmente durante condiciones de estrés como el ayuno. En este sentido Pollero y colaboradores (1991) analizaron el efecto de ayuno por 4 semanas en *M. borelli* cultivado a 29°C, encontrando una disminución significativa en triglicéridos y ácidos grasos libres por efecto de hipertermia pero no por condiciones de ayuno. En base a esto se

podría descartar el ayuno haya causado la disminución de triglicéridos en hepatopáncreas. Por otro lado, se han reportado diversos trabajos donde parte del combustible lipídico ha sido utilizado en condiciones de estrés, observándose una disminución en los niveles de triglicéridos en hemolinfa y/o en hepatopáncreas de camarones sometidos a manipulación crónica (Mercier *et al.*, 2006), estrés salino (Hurtado, 2004), hipertermia a largo plazo (Pascual *et al.*, 2003), aclimatación a 27 y 31°C (Sánchez *et al.*, 2001), indicando su función como una fuente alterna para satisfacer la demanda energética ante diversas condiciones de cultivo.

Respecto al ciclo de muda, en el primer bioensayo se observó que las variaciones de triglicéridos circulantes fueron afectadas significativamente por el estadio de muda pero no por la condición de hipertermia ni por la interacción entre ambos factores (Tabla 19). Los niveles de triglicéridos en hemolinfa alcanzan sus valores más altos en la premuda. Esta variación durante el ciclo de muda se encuentra ampliamente documentada, estableciendo que la concentración de lípidos de todo el organismo alcanza un máximo durante la premuda intermedia (D₂) por acumulación de reservas y posteriormente decrece hacia la premuda tardía (D₃₋₄) (Teshima *et al.*, 1977). Durante este periodo de premuda, antes de que los organismos dejen de alimentarse, se presentan un incremento en la capacidad para almacenar los lípidos ingeridos, así como para sintetizarlos a partir de la ingestión de carbohidratos (Chang y O'Connor, 1983). El aumento de lípidos totales en la etapa D₂ se debe a incrementos en esteroides, ácidos grasos libres y triglicéridos (Teshima *et al.*, 1977).

Los triglicéridos son almacenados principalmente en hepatopáncreas (Chang y O'Connor, 1983), lo cual concuerda con los resultados del presente trabajo donde se observó que entre el 49 y 55 % (en el grupo de ST 35°C y control, respectivamente) de los lípidos totales están constituidos por triglicéridos. Asimismo, se ha reportado que inmediatamente después de la ecdisis las reservas de lípidos en hepatopáncreas se encuentran en su mínima concentración (Chang y O'Connor, 1983), tal como se observa en el grupo control del segundo bioensayo (Fig. 13). Esto es debido tanto a una disminución en la capacidad de síntesis de lípidos, como a un incremento en la tasa de movilización de lípidos provenientes del hepatopáncreas a la hemolinfa, para ser transportados a los sitios donde serán utilizados como recurso energético y componentes estructurales de los organismos en crecimiento durante la postmuda (Chang y O'Connor, 1983). En contraste, después de la hipertermia a 35°C, la concentración de triglicéridos en hepatopáncreas no sigue este mismo patrón, ya que las reservas acumuladas durante la premuda, probablemente fueron rápidamente utilizadas como combustible metabólico para compensar la condición de estrés, reflejándose en una pronunciada disminución de esta variable.

Estos resultados nos permiten concluir que el estadio de muda fue el elemento que afectó en mayor medida los niveles circulantes de triglicéridos, principalmente en postmuda donde se observan los valores más bajos por la falta de alimentación temporal a causa de la ecdisis.

8.2.4 Proteínas totales, hemocianina y expresión de Hsp70

Las proteínas son un componente fundamental en la dieta para el crecimiento de crustáceos (Rosas *et al.*, 2000), además de que pueden representar un recurso importante de energía metabólica al igual que lípidos y carbohidratos (Claybrook, 1983). En el presente estudio se observaron niveles de proteínas totales en hemolinfa que van de 84.6 y 143 mg ml⁻¹ en condiciones basales, hasta 74.8 y 131.5 mg ml⁻¹ en el grupo de estrés, para el primer y segundo bioensayo, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del amplio rango reportado para niveles de proteínas circulantes (de 70 a 700 mg ml⁻¹; Sánchez *et al.*, 2001; Rosas *et al.*, 2002).

En ambas pruebas de estrés se observó un decremento en la concentración de proteínas totales en hemolinfa respecto a su grupo control. Esto indica que, no obstante el poco tiempo de exposición a hipertermia, la condición de estrés a partir de los 32°C fue suficientemente fuerte para incrementar el consumo de proteínas utilizándolas como una fuente alterna que permitiera satisfacer la demanda energética del organismo. Por su parte, las proteínas totales en tejidos no presentaron ninguna variación que permitiera reabastecerlos los niveles circulantes de esta variable a través de la movilización de reservas tisulares a hemolinfa. Es probable que no se diera la movilización de reservas proteicas debido ya sea al poco tiempo de exposición a hipertermia o bien que no fue cuantitativamente detectada dado que la cantidad de proteína tisular es considerablemente mayor a la circulante.

Los niveles de proteína total en plasma se vieron afectados significativamente por el ciclo de muda únicamente en el segundo experimento, con niveles menores en estadio de postmuda. De forma similar, Chen y Cheng (1993), encontraron variaciones en los niveles de proteínas totales en hemolinfa a lo largo del ciclo de muda, registrando los índices más altos en la premuda temprana y los más bajos en la postmuda tardía. Lo anterior se debe muy probablemente a una dilución por acumulación de agua que tiene lugar en el organismo después de la ecdisis (Djangmah, 1970). Asimismo Mugnier y colaboradores (2008) reportan que camarones en D₂ presentan una respuesta fisiológica más intensa al tratamiento de amonio, hipoxia, o por el efecto combinado de éstos. Sin embargo, en ese mismo estudio no fue posible evaluar el efecto de estrés en organismos de postmuda, debido al 75% de mortalidad que se presentó en los organismos de ese estadio, lo cual indica nuevamente, que los camarones son más sensibles al medio ambiente fuera de la intermuda (Mugnier *et al.*, 2008).

La hemocianina constituye la principal proteína en plasma, representando hasta el 95% de la concentración total de proteínas en la hemolinfa de crustáceos decápodos (Chen *et al.*, 1994). Entre sus funciones están el transporte de oxígeno, osmolitos, transportadora de ecdisona, precursora de péptidos antimicóticos y actividad relacionada a la fenoloxidasas (Chen y Cheng, 1993; Destoumieux *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2003). Además, es considerada como proteína de reserva que puede utilizarse en condiciones de ayuno, alimentación restringida o premuda, cuando el organismo deja de ingerir alimento (Hagerman, 1983).

En el presente trabajo, las proporciones de hemocianina en relación a las proteínas totales resultaron de 81 y 71% en condiciones basales, así como del 78 y 74% en el grupo de estrés a 32 y 35°C, respectivamente. La disminución de proteínas en plasma observada en ambas pruebas, fue acompañada también, por un decremento en los niveles de hemocianina que fue significativo únicamente a 32°C. A diferencia de la disminución de hemocianina observada en el presente trabajo, Racotta y colaboradores (2002) reportan un incremento en la concentración de esta proteína en hemolinfa de camarones después de someterlos por dos semanas a condiciones leves de hipoxia (2 mg L⁻¹). Esta respuesta implica una adaptación a un medio hipóxico, al incrementar la capacidad de acarrear oxígeno aumentando la concentración de hemocianina en plasma (Hagerman, 1986). Aun cuando en el presente estudio se observó una ligera hipoxia, es probable que ni el grado de hipoxia (4.16 y 3.92 mg L⁻¹, a 32 y 35° respectivamente) ni el tiempo de exposición (180 min) fueran suficientes para inducir un incremento en la hemocianina. Sin embargo, el hecho de que los valores de hemocianina no disminuyeran significativamente a 35°C podría sugerir un intento de adaptación a las condiciones de hipoxia, teniendo en cuenta que los niveles de OD fueron más bajos en esta segunda prueba. En cualquier caso, debido a la disminución generalizada de la hemocianina, el efecto de la hipertermia parece haber predominado sobre la hipoxia.

La disminución de proteínas en una condición de estrés u otra situación de demanda de energía ha sido documentada ampliamente; por exposición a altas concentraciones de amonio (Chen *et al.*, 1994), ablación del tallo ocular, extirpación del espermatóforo (Perazzolo *et al.*, 2002), hipertermia a largo plazo (Pascual *et al.*, 2003), manipulación crónica (Mercier *et al.*, 2006), entre otros (Sánchez *et al.*, 2001, Pérez-Jar *et al.*, 2006, Mugnier *et al.*, 2008).

Se han propuesto tres principales causas sobre la disminución de proteínas en plasma, las cuales pretenden explicar en forma conjunta la utilización de esta variable en respuesta a diversas condiciones de estrés (Rosas *et al.*, 2004; Mercier, 2007). En primer lugar, se ha reconocido que los camarones cultivados se encuentran bien adaptados a utilizar proteínas como fuente de energía. En segundo lugar, se ha documentado que parte de las reservas proteicas, en forma de aminoácidos libres, son movilizadas con el fin de mantener el equilibrio osmótico, el cual tiende a ser variable en condiciones de cultivo (Rosas *et al.*, 2002; 2004). En tercer lugar, considerando que el sistema de defensa tiene una base proteica, la respuesta inmune dependerá del metabolismo de proteínas (Sritunyalucksana y Söderhall, 2000). Finalmente, como una cuarta propuesta se sugiere que los niveles circulantes de proteínas totales pueden estar relacionados con los cambios de expresión del gen que codifica para Hsp70 (o proteínas de shock térmico).

Respecto a la primera propuesta, sobre la utilización de proteínas como combustible metabólico, se ha reportado que los camarones tienen la habilidad de utilizar la proteína como principal recurso energético (New, 1976; Sánchez-Paz, 2007) a diferencia de los mamíferos y aves, que utilizan principalmente carbohidratos y lípidos como fuente de energía. Como evidencia de esto, se ha demostrado que los camarones pueden sintetizar carbohidratos a través

de la vía gluconeogénica, siendo el metabolismo de proteínas, el principal recurso para la síntesis de glucógeno y glucosa en *L. stylirostris*, *L. setiferus*, *L. vannamei* y otras especies de crustáceos (Rosas *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2006). Esto explicaría el uso de proteína como combustible alternativo a los carbohidratos mencionado anteriormente.

En relación a la segunda hipótesis, se ha documentado que en los organismos sometidos a cambios de salinidad durante el cultivo pueden variar los niveles de proteínas y aminoácidos circulantes como mecanismo orgánico adicional a la regulación de iones (Palacios y Racotta, 2007). En el presente estudio se observa la disminución de proteínas totales en plasma para ambos experimentos, al mismo tiempo que se registra un incremento de la presión osmótica en hemolinfa. Estas variaciones sugieren la posible participación de aminoácidos libres (aunque estos no fueron evaluados), en un intento de reestablecer el balance osmótico en camarones sometidos a hipertermia de 35°C. De manera similar, se ha descrito un decremento en los niveles de proteínas totales y hemocianina en plasma junto con un incremento en los niveles de aminoácidos libres a partir de la hidrólisis de proteínas tanto tisulares como circulantes, con el fin de mantener el balance osmótico en *P. monodon* sometido a altas concentraciones de amonio (Chen *et al.*, 1994).

Respecto a la tercera propuesta, se encuentra bien documentada la participación de proteínas en el sistema de defensa de crustáceos, como las proteínas LPS-BP y BGBP involucradas en el reconocimiento de microorganismo invasores (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000), la proteína de coagulación (Montaño-Pérez *et al.*, 1999), las enzimas que regulan el sistema profenol oxidasa que conducen a la melanización (Sritunyalucksana y Söderhall, 2000), péptidos antimicrobianos como las peneidinas y aglutininas (Destoumieux *et al.*, 2001), las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Smith y Samuelson, 1994), entre otras. En este sentido se ha reportado un decremento en proteínas circulantes simultáneo a una disminución en la capacidad inmune de camarones sometidos a diversas condiciones, tales como aclimatación (Sánchez *et al.*, 2001), extirpación de espermatóforo y ablación del tallo ocular (Perazzolo *et al.*, 2002), hipertermia a largo plazo (Pascual *et al.*, 2003), ayuno (Pascual *et al.*, 2006) y por el efecto combinado de amonio+hipoxia (Mugnier *et al.*, 2008). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la reducción en índices de proteína en organismos estresados esté relacionada a la disminución de proteínas participantes del sistema inmune (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000), comprometiendo la capacidad de defensa del organismo (Perazzolo *et al.*, 2002).

Por último, la cuarta hipótesis propuesta en el presente trabajo sugiere una relación entre los niveles de proteínas totales y la expresión de Hsp70, tomando en cuenta que la función primaria de las HSP70 durante el estrés celular es mantener la traducción y la integridad de las proteínas (Kregel, 2002). Sin embargo, para poder comprobar esta hipótesis, es necesario evaluar más a detalle los patrones de expresión de este gen (en diferentes tejidos y en muestreos a diferentes tiempos). Se ha reportado un incremento en los niveles de expresión de Hsp70 en crustáceos por efecto de diversas condiciones, como hipertermia (Liu *et al.*, 2004a; De

la Vega, 2006), hiposalinidad e hipersalinidad (Chang, 2005), además de observarse en *Dicentrarchus labrax* una sobreexpresión de este gen por alta densidad de cultivo, misma que esta directamente correlacionada con la biomasa (Gornati *et al.*, 2005).

En el presente estudio, también se encontró un incremento casi del doble, aunque no significativo, en la expresión de este gen al exponer camarones a shock térmico de 32°C. Sin embargo y de forma contraria a lo esperado, la expresión de Hsp70 se mantiene cerca de los niveles basales al incrementar la temperatura a 35°C. Estos resultados coinciden con lo reportado por Selvakumer y Geraldine (2005), quienes observaron que la concentración de Hsp70 se induce en branquias y corazón de *M. malcomsonii* a partir de los 30°C, llegando a un nivel máximo entre los 32 y 34°C, a partir de este punto los valores de Hsp70 comienzan a disminuir hasta alcanzar niveles basales a una temperatura de 37°C. En base a estos resultados, los autores sugieren que cuando se rebasa la "temperatura de inducción óptima", a la cual ocurre la máxima inducción de Hsp70, (32 y 34°C para corazón y branquias respectivamente), entonces la síntesis total de proteínas es afectada. Esta temperatura de inducción óptima esta relacionada con el máximo térmico crítico de cada especie y estos a su vez van a depender de la temperatura a la que fueron aclimatados los organismos (Selvakumer y Geraldine, 2005). En base a esto podemos sugerir que los niveles de transcritos de Hsp70 no aumentaron a 35°C, posiblemente por que cerca de 32°C se ubicó la temperatura óptima de inducción, y por arriba de ésta alcanzó el punto máximo térmico, considerando también, que a 37°C se empezó a presentar mortalidad de los organismos (experimentos preliminares). Asimismo, se ha reportado un aumento en los niveles de RNAm para Hsp70 en músculo de langosta *Homarus americanus* al ser sometidas durante una o dos horas a estrés hipertérmico agudo y después de 6 y 12 horas de recuperación a la condición de estrés. Posterior a este lapso de tiempo, los niveles de transcritos regresan a sus valores basales (Spees *et al.*, 2002a). En un estudio posterior, estos mismos autores encuentran nuevamente una sobre-expresión de Hsp70 en músculo de *H. americanus*, al ser sometidos durante media hora o una hora a cambios de salinidad. Después de dos horas de exposición a la condición de estrés, los niveles de transcritos regresan a sus valores basales (Spees *et al.*, 2002b), de igual manera que en el estudio anterior, indicando que el tiempo de exposición (al estímulo de estrés y muestreo), es un factor fundamental que debe ser considerado para poder detectar oportunamente la sobre-expresión del gen estudiado (Spees *et al.*, 2002a y b). En base a esto, podemos suponer que al muestrear tres horas después de exponer a los organismos a estrés hipertérmico, la expresión de Hsp70 podría estar iniciando o bien decayendo, por lo que quizá no fue el tiempo óptimo para detectar oportunamente la sobreexpresión del gen. Asimismo, esta documentado que las variaciones en la expresión Hsp70 son tejido-específicas y dependen del tipo e intensidad del estresor, además del tiempo de exposición a la condición estresante (Tabla 2). Por lo tanto, al analizar la expresión de Hsp70 a diferentes tiempos y en diferentes tejidos se podría establecer el tejido y el tiempo óptimo para la detectar la sobreexpresión del gen.

Como una forma más de explicar la baja expresión de este gen, también se ha sugerido que una disminución en la energía disponible por efecto de estrés hiposalino, puede conducir a niveles reducidos de Hsp70 en almejas *P. amurensis* (Werner, 2004).

Otra posible causa de la baja expresión de Hsp70 en hemocitos de camarones expuestos a hipertermia, podría ser que el gen cuantificado fue más bien el de Hsc70: constitutivo y no el inducible, ya que se ha encontrado que los niveles de transcritos de Hsc70 (proteína constitutiva) pueden llegar a incrementar por efecto de hipertermia en hemocitos de *P. monodon* (Lo *et al.*, 2004) y en músculo de *M. rosenbergii* (Liu *et al.* 2004b). Además de que la secuencia parcial utilizada presenta una homología ligeramente mayor con la proteína constitutiva (80%) que con la inducible (79%) reportada para *L. vannamei*. Considerando estos estudios, es recomendable caracterizar el gen completo a partir de la secuencia utilizada con el fin de confirmar o descartar que se amplificara una secuencia parcial del gen inducible.

Por otra parte, al comparar la secuencia obtenida de Hsp70 con la de otras especies, se encontraron homologías del 78 al 82% respecto a Hsp70 y Hsc70 en especies de camarones peneidos, entre ellas *L. vannamei*, además de un 90-100% de homología con Hsp70 en diversas especies de peces (Tabla 17). El mayor porcentaje de homología con algunas especies de peces tiene dos posibles explicaciones:

En primer lugar, considerando que los oligos fueron diseñados a partir de secuencias de Hsp70 en *P. olivaceus* y *D. labrax*, como se mencionó en la sección de métodos, es probable que esta región del gen Hsp70 sea más conservada en determinadas especies de peces, que en camarones peneidos. Esto se sustenta al encontrar que alineando esta misma secuencia pero en diferentes tejidos (hemocitos y hepatopáncreas) de *L. vannamei*, esta región se conserva en una proporción del 81.5% hasta 97.9%, demostrando una considerable variabilidad dentro de la misma secuencia parcial entre tejidos y entre clonas (ver Anexo IV). Por lo tanto, esto podría ser la causa de una menor homología de nuestra secuencia parcial con la del gen completo de Hsp70 de *L. vannamei*.

En segundo lugar, se ha reportado que es común encontrar mayor similitud entre miembros de la misma subfamilia de proteínas HSP (Hsp-inducibles) de diferentes especies de organismos, que entre distintas subfamilias (Hsp y Hsc-constitutivas) de la misma especie (Liu *et al.*, 2004b), lo cual podría explicar la alta similitud de entre la secuencia de Hsp70 de camarón y la de Hsp70 de *D. labrax*, por tratarse de la misma subfamilia de proteínas.

En resumen, la falta de una sobreexpresión significativa del gen Hsp70 en camarones sometidos a hipertermia de 32 y 35°C se debe posiblemente a tres causas:

- El tiempo utilizado no fue el óptimo para detectar oportunamente la sobreexpresión del gen.
- La baja expresión de Hsp70 cercana a los niveles basales encontrada a 35°C, sugiere que en esta condición de estrés la "temperatura óptima" a la cual ocurre la máxima inducción de este gen, fue rebasada.

- La secuencia cuantificada podría corresponder al gen constitutivo y no al inducible de Hsp70, debido a la moderada expresión observada en los organismos y a su alta homología (98%) de la secuencia proteica, con las hsp constitutivas de *Macrobrachium nipponense* y *Fenneropenaeus chinensis*.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el analizar la expresión de Hsp70 en diferentes tejidos y a diferentes tiempos de exposición, permitirá un mejor entendimiento de la expresión génica en relación con la respuesta fisiológica e inmunológica, con el fin de poder utilizar los niveles de transcritos de Hsp70 como indicadores tempranos de estrés ante distintos factores ambientales o condiciones de cultivo.

8.2.5 Presión osmótica

La osmorregulación es un importante mecanismo fisiológico de adaptación al medio ambiente en especies acuáticas ya que permite mantener el equilibrio iónico que se requiere para desarrollar de forma óptima las funciones biológicas del organismo (Schmidt-Nielsen, 1993). Este mecanismo de regulación es particularmente importante en crustáceos debido a la amplia variación de salinidades a las que están expuestos por su desplazamiento de aguas oceánicas a estuarios a lo largo de su ciclo de vida (Péqueux, 1995). La capacidad osmorreguladora (CO) se define como la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y el medio externo a una salinidad determinada (Charmantier *et al.*, 1984; Lignot *et al.*, 2000), es decir, a mayor diferencia de presión osmótica en la hemolinfa con respecto al medio, mayor será la capacidad osmorreguladora del organismo. La CO es considerada como un indicador de estrés sensible a diversos estímulos, por lo que ha sido utilizada como una herramienta para monitorear el estado fisiológico de camarones peneidos en diferentes condiciones adversas durante su cultivo (Lignot *et al.*, 1999). Se ha documentado que la CO en camarones decrece bajo distintas condiciones, como exposición a hipoxia (Charmantier *et al.*, 1994; Mugnier y Soyez, 2005), insecticidas organofosforados (Lignot *et al.*, 1997), aumento en peso corporal (Lignot *et al.*, 1999); metales como aluminio, cadmio y cobre (Lignot *et al.*, 2000), bajas temperaturas (Lemaire *et al.*, 2002), hipertermia (Pascual *et al.*, 2003), exposición a amonio (Lignot *et al.*, 2000; Mugnier y Justou, 2004), entre otros.

La presión osmótica en hemolinfa de los organismos en condiciones basales resultó de 795.8 y 798.6 mmol kg⁻¹ para el primer y segundo bioensayo, respectivamente. Estos valores se encuentran ligeramente por arriba del punto isosmótico de 718 mmol kg⁻¹ o 24.7 ups reportado para *L. vannamei* (Castille y Lawrence, 1981), teniendo en cuenta que se han reportado valores desde 780 hasta 918 mmol kg⁻¹ en hemolinfa de organismos en un medio con 1065 mmol kg⁻¹ de osmolaridad (Charmantier *et al.*, 1994; Lignot *et al.*, 1999; Hurtado *et al.*, 2007). En el presente estudio, la presión osmótica aumentó en ambas pruebas al someter a los camarones a condiciones de hipertermia, siendo significativo el incremento únicamente a 35°C (Tabla 19).

Considerando que la osmolaridad del medio en las unidades experimentales es de $1160 \text{ mmol kg}^{-1}$ a una salinidad de ~ 37 ups, se puede determinar que la capacidad osmorreguladora del organismo disminuye por condiciones de hipertermia y que el incremento de la temperatura de 35°C se acerca al punto crítico a partir del cual la capacidad osmorreguladora del camarón se ve afectada por estrés.

El efecto de la hipertermia sobre la CO de los organismos puede deberse a su acción sobre las membranas celulares, ya que al estar constituidas por una bicapa lipídica, son muy sensibles a los cambios de temperatura (Randall *et al.*, 1997). A altas temperaturas las membranas pueden volverse "hiperfluidas" con una baja viscosidad, lo cual puede alterar la permeabilidad de la membrana a los iones, promoviendo la pérdida de agua y/o la entrada de iones, perturbando así el balance osmótico (Burton, 1986; Randall *et al.*, 1997). Para compensar la entrada de iones a partir del medio, se esperaría un incremento en la actividad de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa. La glucosa podría ser necesaria como fuente de energía para la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa, responsable de mantener la concentración adecuada a ambos lados de la membrana (Pequeux, 1995; Pascual *et al.*, 2003). Además y tal como ya se mencionó en la sección de proteínas, el incremento de aminoácidos libres representa un forma de compensar un incremento en la osmolaridad, Esto podría explicar la disminución de glucosa y proteínas totales en hemolinfa, posiblemente usadas para suministrar la energía necesaria para la osmorregulación y aminoácidos libres para mantener el equilibrio osmótico.

Además del efecto por temperatura, el estadio de muda también afectó significativamente la presión osmótica en hemolinfa de camarones únicamente en el segundo experimento ($28\text{-}35^\circ\text{C}$). Los valores más altos de osmolaridad fueron observados en premuda, seguidos de postmuda y los más bajos en intermuda, lo cual significa que la capacidad osmorreguladora fue reducida de manera importante en premuda. Se sabe que la permeabilidad al agua, el contenido de agua y la concentración de iones inorgánicos en la hemolinfa, cambian durante el ciclo de muda, resultando variaciones en la presión osmótica concomitantemente con la capacidad osmorreguladora. De manera similar a los resultados obtenidos, se ha reportado que la presión osmótica en hemolinfa es mínima en el estadio C, y aumenta en los estadios de postmuda B, premuda D_0 , D_1 y D_2 , consecuentemente la capacidad hipo-osmótica absoluta de camarones juveniles alcanza valores máximos en estadio C y los mínimos en D_2 (Lignot *et al.*, 1999). En concordancia con estos resultados, se ha reportado que al someter camarones a estrés por amonio, hipoxia y amonio+hipoxia, su capacidad osmótica también disminuye a nivel general y en mayor proporción durante la premuda tardía (D_1 y D_2) que en la intermuda (Mugnier y Soyez, 2005; Mugnier *et al.*, 2004; 2008). Esta disminución en la CO se debe a que durante la muda, la permeabilidad del integumento aumenta, siendo más dependiente de los factores externos (Mugnier *et al.*, 2008). Esta dependencia disminuye gradualmente conforme la permeabilidad del tegumento decrece por el endurecimiento del exoesqueleto (Hunter y Unglow, 1993).

Asimismo, se ha establecido que los dos principales cambios en la regulación iónica y osmótica que ocurren durante el ciclo de muda, corresponden a un incremento en la concentración de hemolinfa previo a la ecdisis y una captación de agua al momento de la ecdisis (Bliss *et al.*, 1966). Los mecanismos involucrados en la alta CO durante la intermuda, se deben posiblemente a un incremento en la actividad ATPasa (secreción activa de iones) y una reducción en la permeabilidad del tegumento (Charmantier *et al.*, 1994).

Finalmente podemos afirmar que la presión osmótica es un sensible indicador de estrés por hipertermia de corto plazo, ya que varía diferencialmente ante el incremento de temperatura (32 o 35°C) y frente a los distintos estadios de muda.

8.3 Respuesta inmune

La modulación de algunos parámetros inmunológicos como una respuesta a condiciones de estrés, puede funcionar como un importante indicador del estado de salud en camarones cultivados (Perazzolo *et al.*, 2002). Dentro de las variables inmunológicas analizadas en el presente estudio, se consideró el tiempo de coagulación, el conteo total de hemocitos, la producción de anión superóxido y la actividad de SOD. De éstas, únicamente las últimas dos variables presentaron variaciones significativas en organismos sometidos a hipertermia.

8.3.1 Conteo total de hemocitos

El conteo total de hemocitos (CTH) ha sido utilizado como un índice de la capacidad de respuesta inmune en camarones peneidos, ya que los hemocitos determinan la defensa celular al responder ante un agente externo con encapsulación, fagocitosis, nodulación, coagulación y la producción de melanina por el sistema profenol oxidasa (Le Moullac *et al.*, 1998; Le Moullac y Haffner, 2000).

En el presente trabajo se encontró una interacción significativa de la condición de estrés por hipertermia de 35°C y el estadio de muda sobre el CTH (Tabla 19), aunque por si solos, estos factores no alteraron los niveles de esta variable. De manera general, se ha documentado una disminución del CTH en camarones expuestos a diversas condiciones de estrés, como exposición a hipoxia severa por 24 horas (Le Moullac *et al.*, 1998; Mugnier *et al.*, 2008), amonio+hipoxia (Mugnier *et al.*, 2008), cautividad por 7 días a 27°C (Sánchez *et al.*, 2001) y ayuno prolongado (Pascual *et al.*, 2006). Perazzolo *et al.* (2002) observaron una disminución de CTH por baja salinidad durante 28 días, extirpación del espermatóforo y ablación del tallo ocular y propusieron el CTH como índice de estrés. En contraste, Liu y Chen (2004) reportaron falta de variaciones significativas en el CTH en *L. vannamei* después de exposición a amonio por 48 horas. La disminución de CTH sugiere que el sistema inmune ha sido afectado (Mugnier *et al.*, 2008), posiblemente a nivel de la modulación de la actividad mitótica del tejido hematopoiético por efecto del estrés ambiental, teniendo consecuentemente un decremento en los niveles de

hemocitos circulantes, mismo que está relacionado con una mayor sensibilidad a patógenos y por lo tanto a contraer enfermedades (Le Moullac *et al.*, 1998; Le Moullac y Haffner, 2000).

Asimismo se ha evaluado en diversos estudios el efecto de la temperatura sobre el CTH, el cual disminuye en un 40% al exponer a *P. stylirostris* a bajas temperaturas (Le Moullac y Haffner, 2000). Por el contrario, se ha reportado un incremento en el CTH durante los dos primeros días de someter a adultos de *L. setiferus* a hipertermia de 33°C. A partir de este punto los niveles de CTH decrecen hasta alcanzar un valor mínimo al día 6 de exposición al estrés, posteriormente los índices de esta variable continúan fluctuando a lo largo de la prueba (Pascual *et al.*, 2003).

En los estudios mencionados anteriormente, la respuesta inmune no fue evaluada antes de las 24 horas de exposición al agente de estrés, por lo tanto no es posible determinar el tiempo de respuesta necesario para inducir variaciones en el CTH. Wang y Chen (2006) también evaluaron esta variable inmune, al someter a *P. monodon* a cambios de temperatura: de 26°C (condiciones basales) a 22 y 34°C. Al transcurrir 12 horas de haber transferido a los organismos, no se presentó ninguna variación significativa en el CTH, sin embargo a partir de las 24 horas y hasta las 96 horas el CTH disminuyó significativamente. Esto podría explicar por qué en el presente trabajo la condición de estrés por sí misma no afectó significativamente el CTH, dado que la exposición de los camarones durante tres horas al incremento de temperatura de 28 a 35°C posiblemente no fue suficiente para inducir una respuesta más pronunciada. Sin embargo, el tiempo de respuesta parece depender de la naturaleza del estresor, dado que también se ha reportado un incremento significativo en el CTH, una hora después de ejercicio por persecución (Jussila *et al.*, 2001). Por tal motivo, es recomendable realizar distintos muestreos a lo largo del tiempo con el fin de evaluar el comportamiento de esta variable inmune y la velocidad con la que son inducidos los cambios del CTH en respuesta a hipertermia aguda.

En relación al ciclo de muda, se mencionó en la sección anterior que es un agente interno que afecta diversas funciones fisiológicas, por lo que también es necesario considerar su efecto sobre el sistema de defensa en *L. vannamei* bajo condiciones de hipertermia. La variación del hemograma en crustáceos decápodos ha sido documentada para *M. japonicus* (Tsing *et al.*, 1989) y *M. rosenbergii* (Cheng *et al.*, 2003), junto con cambios en la actividad hematopoyética durante el ciclo de muda en crustáceos (Hose *et al.*, 1992). En *P. stylirostris*, se ha reportado que el número de hemocitos va aumentando conforme se acerca la muda, alcanzando sus máximos valores en la postmuda tardía B (Le Moullac *et al.*, 1997). Sin embargo, en el presente trabajo, el ciclo de muda no afectó por sí solo el conteo de hemocitos, probablemente por el número reducido de organismos para algunos estadios de muda. Al interactuar la condición de estrés con el estadio de muda, se observó una disminución significativa del CTH por efecto de hipertermia solo durante el estadio de postmuda (Fig. 18), lo cual podría indicar que es el estadio más susceptible a las condiciones ambientales, a diferencia de las variaciones observadas en intermuda y premuda. En la mayoría de los estudios no se contempla el estadio de premuda temprana

(A) para evaluar la respuesta inmune, por ser muy sensible al estrés. No obstante, se ha reportado que la mayor mortalidad de organismos expuestos a amonio se da principalmente en el estadio de postmuda temprana y en premuda tardía por infección con *Vibrio sp.* (Le Moullac *et al.*, 1997), además de una disminución significativa del CTH en el estadio D₂ de *L. stylirostris* por efecto de hipoxia y amonio+hipoxia (Mugnier *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren que a nivel de respuesta inmune, los organismos fuera de intermuda son más sensibles y menos resistentes a las condiciones ambientales.

Este comportamiento en los niveles de hemocitos puede ser un mecanismo de protección ante los cambios que experimenta la cutícula de los camarones durante el ciclo de muda. En la intermuda de camarones peneidos, la cutícula es esclerotizada e impermeable. Posteriormente, en la premuda, el desprendimiento de la cutícula madura puede permitir la penetración de bacterias al organismo a través de la nueva cutícula (Le Moullac *et al.*, 1997). Está documentado que las variaciones en el conteo de hemocitos durante el ciclo de muda de diferentes especies de crustáceos, están relacionadas principalmente a los cambios de las células hialinas, las cuales representan el 80% del CTH (Tsing *et al.*, 1989; Hose *et al.*, 1992; Le Moullac *et al.*, 1997). Aunque en el presente trabajo no se realizó un conteo diferencial de hemocitos, este análisis podría dar mayor información sobre los mecanismos de defensa celular que se activan ante las diversas condiciones de estrés.

Se ha demostrado recientemente que además de la función que desempeñan los hemocitos de camarón en las reacciones celulares inmunes, también comprenden el principal sitio de expresión de genes que codifican para efectores inmunes (Gross *et al.*, 2001). Por lo tanto, una disminución prolongada en el CTH en camarones expuestos a algún estresor fisiológico o ambiental, puede conducir a una inmunodepresión que incrementa a su vez el riesgo de infecciones por microorganismos oportunistas y/o patógenos (Perazzolo *et al.*, 2002).

8.3.2 Anión superóxido

La medición de la producción de anión superóxido (O_2^-) o estallido respiratorio, es considerada como un método preciso para estimar la capacidad de la célula de generar el estallido respiratorio por el proceso de fagocitosis, detectando únicamente la producción de O_2^- intracelular. Para realizar esta determinación, es necesario usar como control la producción de O_2^- por parte de los hemocitos no estimulados, ya que los hemocitos siempre muestran cierta producción basal. Valores altos de producción basal de O_2^- podrían indicar situaciones estresantes durante el manejo *in vitro*. Una alta producción basal de O_2^- también puede reflejar un estado fisiológico del camarón que representa reacciones a estrés o inflamación. En el presente estudio trabajo no se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y el de estrés en la producción basal de O_2^- , lo cual indica un manejo adecuado de los hemocitos durante la medición de esta variable. La habilidad de los hemocitos para producir intermediarios reactivos de oxígeno puede ser considerada como una prueba funcional para evaluar el

potencial inmune a nivel celular y de organismo (Muñoz *et al.*, 2000). Para estimar la capacidad de respuesta de los hemocitos para producir O_2^- ante patógenos, es común estimular estos hemocitos *in vitro* por medio de moléculas típicas de microorganismos, como es el caso del zymosan (complejo de proteína-carbohidrato extraído de la pared celular de *S. cerevisiae*). De esta manera se obtiene la producción estimulada de O_2^- por parte de los hemocitos y es entonces común reportar este valor o, mejor aún, el índice entre la producción estimulada y basal de O_2^- , tal como se calculó en el presente trabajo.

Así, Chim y colaboradores (2001), reportan que la producción basal de O_2^- en hemocitos no fue significativamente modificada por una dieta enriquecida con ácidos grasos altamente polinsaturados (HUFAs), pero que la producción de O_2^- estimulada con zymosan resultó significativamente mayor para organismos alimentados con HUFAs, indicando una mayor capacidad de respuesta inmune. En otros trabajos se ha reportado un incremento significativo en el índice de producción de anión superóxido (estimulada/basal) en *L. vannamei* sometido durante 2 y 7 días a altas concentraciones de amonio (11.1 - 21.6 mg/ml) y una consecuente disminución de la actividad de SOD (Liu y Chen, 2004a).

En el presente trabajo, al igual que para CTH, también se registró una interacción significativa entre el estadio de muda y la condición de estrés por hipertermia (a 35°C). En el grupo control, la producción de anión superóxido va aumentando conforme se acerca a la muda, alcanzando sus valores máximos en la premuda. Posterior al estímulo de estrés de 35°C, la producción de anión superóxido disminuyó significativamente sólo en premuda por la condición de hipertermia. A diferencia del CTH donde el estadio más susceptible fue el de postmuda, en este caso fue el de premuda, mientras que el estadio de intermuda fue el más "resistente" al estrés térmico para ambas variables. De manera similar, Cheng y colaboradores (2003) no observaron variaciones significativas en el estallido respiratorio entre los estadios A,B y D₁,D₂ de *M. rosenbergii* al ser retado con *Lactococcus garvieae*. No obstante los niveles de esta variable alcanzaron los niveles máximos en D₃, donde reportan un 100% de mortalidad. Por lo tanto, los autores señalan que la protección en el camarón ante este agente bacteriano está más relacionada a la actividad profenoloxidasa, mientras que la variación del anión superóxido puede deberse a la acción del sistema antioxidante considerada como inmunomoduladora (Cheng *et al.*, 2003). Aunque en el presente trabajo no se analizó la actividad fenoloxidasa, sería recomendable evaluarla, ya que podría aportar información sobre la resistencia del organismo.

Si bien, la condición de estrés no afectó por sí misma esta variable, se observó que en el grupo de shock térmico de 35°C, el índice de producción de anión superóxido disminuyó significativamente en un 35.8% respecto al grupo control (Fig. 16A). Igualmente, en pruebas de estrés por hipoxia a corto plazo (24 hrs), se registró que el índice de producción de anión superóxido, disminuye bajo las condiciones de estrés (Cheng *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha documentado que el estallido respiratorio en camarones retados con *Vibrio alginolyticus*, disminuye en un 10% después de 12 horas del reto bacteriano y en un 20% posterior a 24 horas,

al mismo tiempo que la actividad SOD disminuye significativamente, indicando cierto agotamiento de los hemocitos para responder ante los patógenos (Hsieh *et al.*, 2008). Además estos autores encontraron una correlación significativa entre los parámetros inmunes de estallido respiratorio, actividad SOD y actividad de profenoloxidasa. De igual manera, se ha reportado que la producción de anión superóxido disminuye junto con la actividad fenoloxidasa y el CTH en camarón *L. vannamei* transferido de 28 a 32°C por un lapso de 24 hasta 96 horas (Cheng *et al.*, 2005) y en *P. monodon* transferido de 26 a 30 y 34°C por el mismo lapso de tiempo (Wang y Chen, 2006). Los trabajos mencionados anteriormente, incluyendo el presente estudio, coinciden con lo establecido generalmente, donde el vigor inmune disminuye en respuesta al estrés por variaciones ambientales (Le Moullac y Haffner, 2000), aportando una evidencia más al respecto.

Referente al papel inmunomodulador del anión superóxido como parte del sistema oxidante-antioxidante, se ha encontrado recientemente que las especies reactivas de oxígeno, pueden actuar como moléculas transductoras de señales, además de participar en la activación de factores transcripcionales intracelulares (como el HSF1: heat shock transcription factor), conduciendo a una transcripción de genes (Scandalios, 2005).

A partir de nuestros resultados podemos sugerir la producción de anión superóxido como un indicador de respuesta inmune sensible a estrés agudo por hipertermia, además de suponer una relación entre esta variable y la actividad de SOD y posiblemente con la expresión de Hsp.

8.3.3 Actividad y expresión de superóxido dismutasa

Como una forma de evaluar parte del sistema antioxidante del camarón, se analizó la actividad de SOD, encontrando que el factor de estrés afectó significativamente los valores en lisado de hemocitos, más no el estadio de muda ni la interacción de ambos factores (Tabla 19). Esta variable en hemocitos de organismos sometidos a shock térmico de 35°C, disminuyó significativamente (en un 37.8%) con respecto al grupo control. Asimismo, la actividad de SOD en hepatopáncreas fue mayor que en plasma pero menor que la registrada en hemocitos, sin observarse diferencias significativas entre grupos del mismo tejido. Lo anterior confirma que la actividad de esta enzima es diferencial según el tejido analizado, de la misma manera que lo reporta Mercier (2007), al observar una mayor actividad antioxidante en hepatopáncreas que en músculo de camarones *L. vannamei* alimentados con distintas concentraciones de HUFA.

La disminución en la actividad de SOD en hemocitos registrada en el presente trabajo, coinciden con lo reportado por Monari y colaboradores (2005), quienes después de someter a bivalvos *Chamelea gallina* a condiciones de hipoxia (0.01 - 0.06 mg/ml de O₂) por periodos de 24 o 48 horas, encontraron que la actividad de SOD disminuyó pronunciadamente en lisado de hemocitos y en menor proporción, en plasma. Los autores sugieren que la disminución de la actividad de SOD es consecuente a un posible decremento en la generación de ROS, por el efecto inhibitorio de la respuesta inmune celular a causa de la liberación de noradrenalina bajo

condiciones de estrés (Lacoste *et al.*, 2001). Asimismo, se ha documentado en diversos trabajos una disminución en la actividad de esta enzima ante diferentes condiciones de estrés. Hsieh y colaboradores (2008) registraron un decremento en la actividad de SOD a partir de las 12 horas de haber retado camarones *P. vannamei* con la bacteria *V. alginolyticus*. Igualmente, se ha reportado una disminución en la actividad de SOD, acompañada de un decremento en el CTH, el estallido respiratorio y la actividad fenoloxidasa, al someter a camarones *L. vannamei* (Cheng *et al.*, 2005) y *P. monodon* (Wang y Chen, 2006) a cambios de temperatura (de 28 a 32°C; de 26 a 22 y 34°C, respectivamente) seguidos de reto bacteriano, aumentando por consecuencia, la susceptibilidad a enfermedades. Tomando como sustento los estudios mencionados, se sugiere que la variación de temperatura, como el shock térmico de 35°C aplicado en el presente trabajo, disminuyen la capacidad inmune de los organismos al afectar el sistema oxidante-antioxidante en camarones estresados.

Por otra parte, se ha encontrado que la disminución en la actividad de SOD en bivalvos, coincide con el decremento en la expresión de su gen por exposición a hipoxia (Monari *et al.*, 2005). Wang *et al.* (2007) analizó la expresión de diversos genes relacionados con el sistema inmune en *L. vannamei*, entre ellos la MnSOD citosólica, y encontraron que la expresión de este gen es mayor en músculo que en hemocitos y hepatopáncreas, pero a la fecha no hay estudios en crustáceos donde se comparen los resultados obtenidos sobre actividad enzimática con los de la expresión del gen de MnSO.

En la actualidad se sabe que el genoma puede responder de forma rápida, específica y selectiva, ya sea incrementando o disminuyendo la expresión de determinados genes durante periodos de estrés. Se ha propuesto que los genes sobreexpresados serán críticos en la sobrevivencia del organismo ante condiciones adversas (Scandalios, 2005). El estudio sobre los genes que "responden ante el estrés", es fundamental en el conocimiento de la biología básica, además de tener importantes implicaciones en productividad acuícola, entre otros sectores de desarrollo (Scandalios, 2005).

En el presente estudio además de evaluar la actividad de SOD, se analizó el nivel de expresión del gen que codifica para MnSOD citosólica en hemocitos por PCR en tiempo real, bajo condiciones de estrés por hipertemia, encontrando un incremento no significativo en la expresión de SOD a 32°C y en menor proporción a 35°C respecto a los niveles basales. Si bien la magnitud del incremento fue considerable (del 80.3% a 32°C y 44.6% a 35°C), la falta de significancia en los niveles de transcritos de MnSOD se debió en parte, a la gran variabilidad individual. Posiblemente debido a estas variaciones individuales, no se observó una coincidencia entre la pronunciada disminución de la actividad enzimática de SOD en hemocitos y el ligero incremento en los niveles de mRNA por hipertermia de 35°C. Sin embargo, es necesario mencionar que no todos los transcritos llegarán a ser traducidos en proteínas, debido a procesos post-transcripcionales (Alberts *et al.*, 1996). En este sentido, se ha documentado que cuando un agente induce la expresión de genes que codifican para proteínas del sistema inmune, no necesariamente se presenta una respuesta inmune coordinada y vice versa (Smith *et al.*, 2003).

Además de la variación de respuesta entre organismos y los procesos postranscripcionales, el tiempo de exposición al estímulo de estrés, así como el tejido analizado, pudieron estar involucrados en la falta de significancia en la expresión de MnSOD, tal como se mencionó anteriormente para Hsp70. En referencia a esto, se ha detectado la expresión de MnSOD en diferentes tejidos de *L. vannamei* y *F. chinensis*, como hepatopáncreas, intestino, músculo, branquias, hemocitos, corazón, ovario, sistema nervioso y pleópodos, por medio de expresión diferencial (Gómez-Anduro *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Encontrando que los niveles de mRNA para cMnSOD son más abundantes en branquias y pleópodos de camarón blanco, mientras que la expresión en corazón y músculo fue la menor (Gómez-Anduro *et al.*, 2006). Asimismo, se ha reportado que después de infectar camarones con virus del síndrome de mancha blanca, la expresión de este gen varía dinámicamente a lo largo del tiempo (Gómez-Anduro *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). La sobre-expresión de cMnSOD alcanzan su máximo valor, después de una hora de haber infectado a los organismos, a partir de ese punto disminuye, regresando a los niveles basales de mRNA a la hora 6, y continúa disminuyendo hasta ser significativamente menor que el control en la hora 12 posterior a la infección, sugiriendo la inducción de cMnSOD como parte de la respuesta de detoxificación por ROS (Gómez-Anduro *et al.*, 2006). Con sustento en los trabajos mencionados, podemos suponer que analizando los niveles de mRNA en distintos tiempos a lo largo del bioensayo, será posible encontrar variaciones significativas en la expresión génica de MnSOD por efecto de hipertermia a 32 y 35°C.

Se conoce que el estrés térmico induce concomitantemente un estrés oxidativo (Flanagan *et al.*, 1998). Este fenómeno puede ser resultado de cambios conformacionales inducidos por calor en un número de enzimas que fomentan el incremento en la producción de ROS (Downs *et al.*, 2001). Además se sabe que el incremento de temperatura aumenta el consumo de oxígeno (Schmidt-Nielsen, 1993) y se ha documentado que el incremento en el consumo de oxígeno resulta en una elevada producción de anión superóxido. En este sentido, aunque el sistema oxidante-antioxidante no fue evaluado en la prueba de hipertermia de 32°C, podemos sugerir que el aumento de expresión de MnSOD, puede estar indicando que la célula ha sido sometida a estrés oxidativo por efecto de hipertermia a 32°C.

El presente trabajo demuestra que la actividad de SOD en hemocitos, es un indicador sensible a estrés agudo por hipertermia de 35°C, afectando parte del sistema antioxidante en camarón blanco. No obstante, se recomienda llevar a cabo muestreos en un mayor número de organismos, a diferentes tiempos y en distintos tejidos, con el fin de determinar de manera más precisa los patrones de expresión de SOD.

8.3.4 Tiempo de coagulación (TC)

La coagulación es una respuesta esencial para organismos que tienen sistema circulatorio abierto, como los crustáceos, porque además de evitar la pérdida de hemolinfa, previene la diseminación de microorganismos introducidos a través de una herida (Montaño-Pérez *et al.*,

1999). La medición de esta capacidad podría ser un importante parámetro valorativo para utilizarse en los monitoreos de granjas acuícolas ya que la proteína de la coagulación esta relacionada con el estado nutricional y de salud de los organismos (Montaño-Pérez *et al.*, 1999) y es fácil de determinar.

En el presente trabajo no se encontraron variaciones significativas en el TC de organismos sometidos a hipertermia de 32 y 35°C. Además, el TC no se vio afectado por el estadio de muda ni por su interacción con la condición de estrés. En contraste, se encuentra documentado que en el cangrejo *Emerita asiatica*, el TC aumenta conforme se incrementa la temperatura (Ravindranath, 1975). Esta tendencia no fue observada en el presente estudio, debido posiblemente a las marcadas diferencias en el tiempo de exposición a los cambios de temperatura (3 horas en presente trabajo y a partir de 1 minuto en el trabajo de Ravindranath, 1975) y a las diferentes técnicas utilizadas para cuantificar el tiempo de coagulación.

Por otro lado, Jussila y colaboradores (2001), reportan que langostas *Panulirus cygnus* sometidas a 2 minutos de ejercicio por persecución y una hora de recuperación, presentan un TC significativamente menor respecto a sus condiciones basales. Conjuntamente, estos autores encuentran una relación significativa entre el CTH y el TC, donde a mayor número de células totales, menor TC. Esta relación entre CTH y TC permite explicar dos cuestionamientos. En primer lugar, la falta de variación en el tiempo de coagulación por efecto de shock térmico, puede deberse a que el CTH a 35°C tampoco resultó afectado. En segundo lugar, el reducido TC registrado (de 16-20 segundos), se debe probablemente al alto número de hemocitos observados (17 a 19 10^6 ml^{-1}) a 35°C en camarón, en comparación un tiempo de coagulación de 45 segundos y una CTH: 6.2 10^6 ml^{-1} para la langosta (Jussila *et al.*, 2001). Como una evidencia más de la relación entre estas variables, Yoganandhan y colaboradores (2003), reportan un incremento en el TC junto con un decremento en el CTH en *P. indicus* infectado con virus del síndrome de mancha blanca.

8.4 Panorama Integral y cumplimiento de hipótesis

En resumen, la hipótesis del presente trabajo se cumplió parcialmente, ya que el estrés por hipertermia a corto plazo aumentó la demanda energética en *L. vannamei* promoviendo una respuesta fisiológica representada por hiperglicemia en conjunto con una disminución en los niveles de proteínas totales y hemocianina circulante por efecto de hipertermia a 32°C, además de una disminución de los triglicéridos circulantes en el estadio de postmuda. A partir de 35°C se alcanza un límite fisiológico donde las reservas circulantes de glucosa y proteínas totales son reducidas significativamente sin presentarse un reabastecimiento que permita tener combustible metabólico circulante disponible. La condición de estrés a 35°C afectó la capacidad osmótica e inmune del organismo, caracterizada por una supresión del sistema oxidante-antioxidante (Actividad SOD y producción de anión superóxido) y del CTH. En algunos casos, el estadio de muda presentó un efecto aislado o de interacción con la condición de estrés, lo que nos permitió observar que la mayoría de las alteraciones en las variables analizadas se dan fuera de la intermuda, sugiriendo que el camarón blanco alcanza su mayor estabilidad metabólica e inmunológica en el estadio C, siendo el estadio óptimo para la manipulación o transportación de los camarones a nivel de cultivo. Contrariamente a lo esperado, no se detectó una sobre-expresión significativa de Hsp70 y MnSOD promovida por hipertermia, por lo que se recomienda llevar a cabo muestreos en un mayor número de organismos, a diferentes tiempos y en distintos tejidos, con el fin de determinar de manera más precisa los patrones de expresión de estos genes. A partir de estos resultados, se propone la glucosa, proteínas totales y la capacidad osmótica en hemolinfa, además de la actividad de SOD, la producción de anión superóxido y el CTH, como indicadores sensibles de estrés por hipertermia aguda, aportando al acuicultor una posible herramienta que le permita tener un panorama más amplio sobre el estado de salud del organismo en respuesta a un determinado factor de estrés.

IX CONCLUSIONES

- El estrés por hipertermia aguda de 32°C afectó la condición fisiológica de *L. vannamei*, promoviendo hiperglicemia así como un decremento en los niveles de proteína total y hemocianina circulantes, como respuestas a un incremento de demanda energética para compensar la condición de estrés.
- El estrés por hipertermia aguda de 35°C, alcanza un límite fisiológico donde las reservas circulantes de glucosa y proteínas totales son reducidas significativamente, siendo utilizadas como combustibles metabólicos.
- El estrés por hipertemia aguda de 35°C, al igual que otras situaciones de estrés, disminuyó la capacidad osmorregulatoria de los organismos, acentuándose este efecto en premuda.
- El estrés por hipertermia aguda de 35°C, afectó la capacidad de respuesta inmune, suprimiendo parte del sistema oxidante-antioxidante (Actividad SOD) y en interacción con el estadio de muda promovieron una disminución en la producción de anión superóxido y el CTH.
- El estadio de muda presenta un efecto aislado o de interacción con la condición de estrés, lo que permite observar que fuera de la intermuda, el organismo es más sensible a las condiciones ambientales, tanto a nivel fisiológico como inmunológico.
- Los mejores indicadores de estrés con posible aplicación a la acuicultura fueron los niveles de glucosa y proteínas totales en hemolinfa, la capacidad osmorreguladora, el CTH, la producción de anión superóxido y actividad de SOD en hemocitos.
- La ligera sobre-expresión de los genes de Hsp70 y SOD, permite proponerlos como potenciales indicadores tempranos de estrés, por lo que se recomienda realizar subsecuentes estudios a distintos tiempos y en diferentes tejidos que permitan determinar de manera más precisa los patrones de expresión de estos genes.

Perspectivas para futuras investigaciones sobre el tema:

1. Llevar a cabo muestreos en un mayor número de organismos, a diferentes tiempos de exposición al factor de estrés y en distintos tejidos, con el fin de elucidar los patrones de expresión de Hsp70 y MnSOD.
2. Caracterizar el gen completo a partir de la secuencia utilizada de Hsp70 con el fin de confirmar que se amplificó una secuencia parcial del gen inducible.
3. Diseñar sondas específicas para Hsp70 y Hsc70 de *Litopenaeus vannamei* para evaluar y comparar sus niveles de expresión ante condiciones de estrés.
4. Evaluar las variables fisiológicas e inmunológicas sugeridas como indicadores sensibles (en el presente trabajo), además de la expresión de los genes Hsp70 y MnSOD, en *L. vannamei*, ante condiciones de estrés propias de las prácticas acuícolas, como podría ser la alta densidad de cultivo, la infección con algún agente patógeno, entre otras, o bien para la valoración de algún inmunoestimulante comercial o experimental.
5. Considerar un mayor número de individuos por estadio de muda para analizar si hay respuestas diferenciales en función del ciclo de muda.

X. REFERENCIAS

- Adachi K., Hirata T., Nishioka T. y Skaguchi M. 2002. Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Molec. Biol.* 134, 135-141.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D. 1996. En: *Biología molecular de la célula*. 4a edición. Editorial Barcelona, España,
- Applied Biosystems, 1997. User bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence detection system, <http://hcg.unh.edu/protocol/realtime/UserBulletin2.pdf>.
- Bachère E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, 191, 3-11.
- Bachère E., 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*, 227, 427-438.
- Barnes H. y Blackstock J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12, 103-118.
- Barraco M.A., Duvic B. y Söderhäll K., 1991. The β -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell and Tissue Research*, 266, 491-497.
- Barton B. A. y Iwama G. K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids, *Annual Rev. of Fish Diseases*, 3-26.
- Bayne B.L., 1975. Aspects of physiological condition in *Mytilus edulis L.* with respect of the effects of oxygen tension and salinity. *Proc. Ninth Eur. Mar. Biol.*, 213-238.
- Bayne C.J., 2003. Origins and evolutionary relationships between the innate and adaptative arms of immune systems. *Integ. Comp. Biol.*, 43, 293-299.
- Bendich A., 1993. Antioxidants, immune response and animal function. Physiological role of antioxidants in the immune system. *J. Dairy Sci*, 76:2789-2794.
- Berg J. M., Tymoczko L. J. y Stryer L., 2002, capitulo. En: *Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Boyd C. E. y Watten B. J., 1989. Aeration systems in aquaculture. *Rev. Aquat. Sci.*, 1, 425-472.
- Boyd C. E., 1990. Water quality in ponds for aquaculture. En: *Developments in aquaculture and fisheries science*. Elsevier, New York, USA. pp. 482.
- Bliss E. D., Wang M.S. y Martínez A. E. 1966. Water balance in th land crab, *Gecarcinus lateralis*, during the intermolt cycle. *Am. Zool.*, 6, 197-212.
- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bridges C. R. y Brand A. R. 1980. Oxygen consumption and oxygen-independence in marine crustaceans. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2, 133-141.
- Brouwer M., Brouwer T.H. y Grater W., 1997. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutasa and that Mn-superoxide dismutasa is localized to the mitochondria. *Biochemistry*, 36:13381-8.

- Brouwer M., Brown-Peterson N., Larkin P., Manning S., Denslow N. y Rose K., 2005. Molecular and organismal indicators of chronic and intermittent hypoxia in marine crustacea. En: Bortone S. (Ed.). *Estuarine Indicators*, CRC Press, pp. 261-276.
- Burton R. F., 1986. Ionic regulation in crustacea: the influence of temperature on apparent set points. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A, 135-139.
- Campa-Córdova A., Hernández-Saavedra N., Aguirre-Guzmán G. y Ascencio F., 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón Blanco *Litopenaeus vannamei* expuestos a inmunoestimulantes. *Ciencias Marinas*, 31,661-669.
- Castille F.L. y Lawrence A.L., 1981. The effect of salinity in the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 293-296.
- Chang E. y O'Connor D., 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: Bliss D., Mantel L. (Eds.), *The biology of crustacea*. Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation, Academic Press, New York, pp. 263-287.
- Chang E., 1991. Crustacean molting hormones: cellular effects, role in reproduction and regulation by molt. Inhibiting hormone. En: Deloach P.F., Dougherty W.J. y Davidson M.A. (Eds.), *Frontiers of shrimp research*. Elsevier, Amsterdam, pp. 83-105.
- Chang E., Ghang S., Beltz B. y Kravitz E., 1999. Crustacean hyperglucemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *J. Comp. Neurol.* 414, 50-56.
- Chang Ernest, 2005, Stressed-out Lobsters: Crustacean hyperglycaemic hormone and stress proteins, *Integr. Comp. Biol.* 45:43-50.
- Charmantier,G., Charmantier-Daures,M., and Aiken,D.E., 1984. Neuroendocrine control of hydromineral regulation in the American lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards 1837 (Crustacea, Decapoda) 1. Juveniles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54, 8-19.
- Charmantier G., Soyez C., Aquacop, 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 178, 233-246.
- Chen H.C. y Slinn J.D., 1980. Osmoregulation of the prawn *Palaemon elegans* exposed to some heavy metals. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 7, 1-13.
- Chen J. C. y Cheng S. Y., 1993. Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 293-296.
- Chen J.C., Chen C.T., Cheng S.Y., 1994, Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 110, 85-94.
- Chen J.C. y Cheng S.Y., 1996. Hemolymph osmolality, acid-base balance, and ammonia excretion of *Penaeus japonicus* bate exposed to ambient nitrite. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 151-155.
- Cheng W., Liu C. H., Hsu J. P. y Chen J. C. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant fresh water prawn *Machrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish & Shell. Immunol.*, 13, 351-365.

- Cheng W., Juang F. M., Li J.T., Lin M.C., Liu C. H. y Chen J.C., 2003. The immune response of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to the moult stage. *Aquaculture*, 218, 33-45.
- Cheng W., Wang L.U. y Chen J.C., 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 250, 592-601.
- Chim, L., Lemaire, P., Delaporte, M., Le Moullac, G., Galois, R. y Martin, J.L.M., 2001. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defenses and the resistance of penaeid prawns to environmental stress? *Aquacult. Res.* 32, 91-94.
- Cimino E.J., Owens L., Bromage E. y Anderson T., 2002, A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 132A: 591-598.
- Claybrook L. D., 1983. Nitrogen metabolism. En: Bliss D., Mantel L. (Eds.), *The biology of crustacea*. Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation, Academic Press, New York, pp. 163 - 213.
- CONAPESCA, 2004. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. SAGARPA, Sinaloa, México, pp. 218.
- Cuzon G. y Barbieri M.A. 1980. Improved nutrient specification for linear programming of penaeid rations. *Aquaculture*, 9, 313-323.
- Cuzon G., Lawrence A., Gaxiola G., Rosas C. y Guillaume J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235, 513-551.
- Da Silva S. M. R. y Kucharski L. C. R., 1992. Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet . *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology*, 101, 631-634.
- De la Peña D. L., Tamaki T., Momoyama K., Nakai T. y Muroga K. 1993. Characteristics of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 115, 1-12.
- De la Vega E., Hall M., Degnan B. y Wilson K., 2006. Short-term hyperthermic treatment of *Penaeus monodon* increases expression of heat shock protein 70 (HSP70) and reduces replication of gill associated virus (GAV). *Aquaculture*, 253, 82-90.
- DeLorenzo M. E., L. Serrano, K.W. Chung, J. Hoguet y P.B. Key, Effects of the insecticide permethrin on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 64, 122-127.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., van Dorsselaer A., Rodriguez J. y Bachère E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapada). *J. Biol. Chem.*, 272, 28398-28406.
- Destoumieux D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P. y Bachère E., 2001. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* 276, 47070-47077.
- Djangmah J. S., 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *crangon vulgaris* (fabricius). *Comp. Biochem. Physiol.* 32, 709-718.

- Downs C. A., Fauth, J.E., y Woodley, C., 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: A molecular biomarker system, Mar. Biotech. , 3, 380-397.
- Drach P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les crustacés décapodes. Ann. Inst. Océanogr. Mónaco, 19, 103-391.
- FAO, 2004. Visión general del sector acuícola nacional. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico.
- FAO, 2005. Síntesis regional del desarrollo de la acuicultura: América Latina y el Caribe, Circular de pesca no. 1017/1., <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0651b/a0651b00.pdf>. pp. 194.
- FAO, 2006. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006. Roma, Italia, pp.198.
- Feder M.E., G.E. Hofmann, 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. Ann. Rev. Physiol. 61, 243-282.
- Fingerman M., Nagabhushanam R., Sarojini R., y Reddy P.S., 1994. Biogenic amines in crustaceans: Identification, localization, and roles. J. Crust. Biol. 14, 413-437.
- Fingerman M., 1997. Crustacean Endocrinology: A retrospective, prospective and introspective analysis. Physiol. Zool. 70, 257-269.
- Flanagan W. S., Moseley L. P. y Buettner R. G. 1998. Increased Flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonante spin trapping. FEBS letters, 431, 285-286.
- Gómez-Anduro G., Barillas-Mury C., Peregrino-Uriarte A., Gupta L., Gollas-Galván T., Hernández-López J. y Yepiz-Plascencia G., 2006. The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular cloning and expression. Develop. Comp Immunol. 30, 893-900.
- Gornati R., Papis E., Rimoldi S., Chini V., Terova G., Prati M., Saroglia M. y Bernerdini G., 2005. Molecular markers for animal biotechnology: sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) HMG-CoA reductasa mRNA. Gene, 344, 299-305.
- Gross P. S., Bartlett T. C., Browdy C. L., Chapman R. W. y War G. W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp *Litopenaeus setiferus*. Dev. Comp. Immunol., 25, 565-577.
- Gutiérrez A., Nieto J., Pozo F., Stern S. Y Schoofs L., 2007. Effect of insulin / IGF-I like peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*. Gener. Comp. Endocr. 153, 170-175.
- Hagerman L., 1983. Haemocyanin concentration of juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding conditions. Mar. Biol. 77, 11-17.
- Hagerman L., 1986. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia. Comp. Biochem. Physiol., 85A, 721-724.
- Hagerman L., Sondergaard T., Weile K., Hosie D. y Uglow F. R., 1990. Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephrops norvegicus* under hypoxia. Comp. Biochem. Physiol., 97A, 51-55.

- Hall M.R. y Van Ham E.H., 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. J. World Aquacult. Soc., 29, 290-299.
- Hall D.M., Oberley T.D., Moseley P.L., Buettner G.R., Oberley L.W., Weindruch R. y Kregel K.C., 2000. Caloric restriction improves thermotolerance and reduces hyperthermia-induced cellular damage in old rats. FASEB J., 14, 78-86.
- He H. y Lawrence A.L., 1993. Vitamin C requirements of the shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 114, 305-316.
- Heath J. R. y Barnes H., 1970. Some changes in biochemical composition with season and during the molt cycle of the common shore crab, *Carcinus maenas* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 5, 199-233.
- Hernández H. R. 1998. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de amonio sobre el metabolismo del camarón blanco (*Penaeus vannamei*), en condiciones de laboratorio. Tesis para Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, pp.
- Hernández R.. M., Bückle R. L.F., Palacios M. E. y Baron S. B., 2006. Preferential behavior of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) by progressive temperature-salinity simultaneous interaction. Journal of Thermal Biology, 31, 565-572.
- Herse H. G. y Hue L., 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. Ann. Rev. Biochem. 52, 617-653.
- Hill W. R., 1976. Metabolic responses to oxygen deficiency and lowered availability of oxygen. En: Comparative physiology of animals, an environmental approach. Harper & Row Publishers, New York. Pp 491-531.
- Hochachka P. W. y Somero G, 1984. Temperature adaptation. En: Biochemical adaptation, Princeton University Press, New Jersey, pp 355-449.
- Homblad T. y Söderhäll K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture, 172, 111-123.
- Hopkin S. R., Qari S., Bowler K., Hyde D. y Cuculescu M. 2006. Seasonal thermal tolerance in marine crustacean. J. Exp. Mar. Biol. 331, 74-81.
- Hose J. E., Martin G. G., Tiu S. y McKrell N., 1992. Patterns of haemocyte production and release throughout the molt cycle in the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. Biol. Bull. 183, 185-199.
- Hsieh S.L., Ruan Y.H., Li Y.C., Hsieh P.S., Hu C.H. y Kuo C.M., 2008. Immune and physiological responses in pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. Aquaculture, 275, 335-341.
- Hunter D. A., Uglow R. F., 1993. Moulting stage-dependent variability of haemolymph ammonia and total protein levels of *Crangon crangon* (L.) (Crustacea, Decapoda). Ophelia, 37, 41-50.
- Hurtado O. M. A., 2004. Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en los mecanismos de osmorregulación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone) expuestos a estrés hipo e hipersalino a corto y largo plazo. Tesis para M. en C., CIBNOR, La Paz, B.C.S., pp.143.
- Hurtado O. M. A., Racotta I.S., Civera R., Ibarra L., Hernández-Rodríguez M., Palacios E., 2007. Effect of hypo- and hypersaline conditions on osmolality and Na⁺/K⁺-ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low- and high-HUFA diets. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integ. Physiol., 147, 703-710.

- Johansson M.W., Pia P., Sritunyalucksana K. y Söderhäll K, 2000. Crustacean hemocytes and hematopoiesis. *Aquaculture*, 191, 45-52.
- Joseph A. y Philip R., 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture*, 272, 87-97.
- Juárez M.L., 2008. Current status of shrimp aquaculture in México. *Panorama Acuicola Magazine*, ene/feb, 48-53.
- Jussila J., McBride S., Jago J. y Evans L., 2001. Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George). *Aquaculture*, 199, 185-193.
- Keller R., 1992. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. *Experientia*, 48, 438-448.
- Kiang J.G. y Tsokos G.C., 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol. Ther.*, 80, 183-201.
- Kinne O., 1990. Temperature, animals, invertebrates. En: *Marine Ecology*. Vol. I: Environmental factors, Parte 2. Londres, Wiley Interscience, 407-514.
- Koehn R. K. y Bayne B. L., 1989. Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological J of the Linnean Society*, 37, 157-171.
- Kramer M. y Coen D., 1999. The polymerase chain reaction. En: Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J. y Smith J. (Eds.). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. NY, USA. 15.0.3-15.1.15.
- Kregel C.K., 2002. Molecular Biology of Thermoregulation, Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, *J. Appl. Physiol.*, 92, 2177-2186.
- Lacoste A., Malham S. K., Cueff A., Poulet S. A., 2001, Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2304-2309.
- Lagerspetz K. Y. y Vainio L.A., 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biological Reviews*, 81, 237-258.
- Lee D. O. y Wickins J., 1992. *Crustacean farming*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, U.K. Pp. 464.
- Lemaire P., Bernard E., Martínez-Paz J. A. y Chim L. 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 209, 307-317.
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., y Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 227-234.
- Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Ansquer D., Avarre J.C., y Levy P., 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 621-629.
- Le Moullac G. L. y Haffner P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, 191, 121-131.

- Li J.T., Lee P.P., Chen O.C., Cheng W. y Kou C.M., 2005. Dopamine depresses immune ability and increases susceptibility to *Lactococcus graviae* in freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Fish and Shellfish Immunol., 19, 269-280.
- Liao I. C. y Murai T. 1986. Effects of dissolved oxygen, temperature and salinity on the oxygen consumption of the grass shrimp, *Penaeus monodon*. The first asian fisheries forum. En: Maclean J.L., Dizon L. B. y Hosillos L.V. Asian fisheries society, Manila, Philippines, 641-646.
- Lignot J. H. Trilles J.P., Charmantier G., 1997, Effects of organophosphorous insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea : Decapoda), Mar. Biol. 128, 307-316.
- Lignot J.H., Cochard J.C, Soyeux C., Lemaire P. y 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.
- Lindquist S., 1986. The heat shock response. Annu. Rev. Biochem., 55, 1151-1191.
- Liu C. H. y Chen J.C., 2004, Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 16, 321-334.
- Liu J., Yang W.J., Zhu X.J., Karouna-Reiner N.K. y Rao Ranga K., 2004b. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Cell Stress & Chaperones, 9, 313-323.
- Liu Y., Wang W.N., Wang A.L., Wang J.M. y Sun R.Y., 2007. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. Aquaculture, 265, 351-358.
- Lo W.Y., Liu K.F., Liao I.C. y Song Y.L., 2004. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Cell Stress & Chaperones, 9, 332-343.
- Lorenzon S., Edomi P., Giulianini P., Mettullo R. y Ferrero E.A., 2004. Variation of crustacean hyperglucemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. J. Exp. Biol., 207, 4205-4213.
- Lüschen W., Willig A., y Jaros P.P., 1993. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the Decapod crustacean, *Carcinus maenas* L. Comp. Biochem. Physiol. 105C, 291-296.
- Marques M.R. y Barraco M.A., 2000. Lectins, as non-self recognition factors in crustaceans. Aquaculture, 191, 23-44.
- Martin G.G. y Graves B.L., 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185, 339-348.
- Martinez-Cordova. L., Villareal C. H. y Cortés J.E., 1999. Capítulo 1: Biología del camarón. En: Martínez Córdova L. (Ed.). Cultivo de camarones pendedos, principios y prácticas, AGT Editor S.A., D.F., México, 1-20.
- Martinez-Cordova. L., 2002. Camaronicultura, avances y tendencias. AGT Editor S.A., D.F., México, Pp. 167.

- Martínez-Palacios C. A., Ross L. G. y Jimenez V. L., 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei*, Boone 1931. J. Aqua. Trop., 11, 59-65.
- McCord J. y Fridovich I., 1969, Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J. Biol. Chem., 244, 6046-6055.
- McNamara C. J., Rosa C. J., Greene J. L., y Augusto A., 2004. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustácea, decapoda) during long-term salinity acclimation. Mar. Freshw. Behav. Physiol., 37, 193-208.
- Merchie G., Kontara E., Lavens P., Robles R. y Sorgeloos P., 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquacult. Res., 29, 579-585.
- Mercier L., Palacios E., Campa-Córdova A., Tovar-Ramírez D., Hernández-Herrera R., Racotta I.S., 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture, 258, 633-640.
- Mercier L., 2007. Influencia de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) sobre el sistema de defensa y la susceptibilidad al estrés en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis para D. en C., CIBNOR, La Paz, B.C.S., pp. 257.
- Mizzen L.A. y Welch W.J., 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. J. Cell Biol, 106, 1105-1116.
- Monari M., Matozzo V., Foschi J., Marin M.G., Cattani O., 2005, Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina* II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes, J. Exp. Marine Biol. Ecol. 325, 175-188.
- Montaño-Pérez K., Yepiz-Plascencia G., Higuera-Ciapara y Vargas-Albores F., 1999. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol., 122B, 381-387.
- Moseley P.L., 1997, Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism, J. Appl Physiol., 83: 1413-1417.
- Moseley P.L., 2000. Exercise, stress and the immune conversation. Exerc. Sport Sci. Rev., 28, 128-132.
- Mugnier C. y Justou C. 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. J. Exp. Mar. Biol. 309, 35-46.
- Mugnier C. y Soyeux C., 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. Aquaculture, 244, 315-322.
- Mugnier C., Zipper E., Goarant C. y Lemonnier H., 2008. Combined effect of exposure to ammonia and hypoxia on the blue shrimp *Litopenaeus vannamei* survival and physiological response in relation to molt stage. Aquaculture, 274, 398-407.
- Muñoz M., Cedeño R., Rodríguez J., Van der Knaap W.P., Mialhe E., Bâchere E., 2000. Measurement of reactive oxygen immediate production in haemocytes of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 161: 475-483
- Muñoz M., Vandenbulcke F., Gueguen Y. y Bâchère E., 2003. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. Develop. Comp. Immunol., 27, 283-289.

- Neill W., 1989. Effects of temperature and oxygen on biology of aquatic organisms: implications for aquaculture. *J. World Aquac. Soc.*, 20, 54.
- Nappi A.J. y Ottaviani E., 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22, 469-480.
- New M. B., 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture*, 9, 101-144.
- Newman S.G., 2000. Management and prevention of stress in aquaculture with a focus on farmed shrimp. Fourth Latin American Aquaculture Congress and Seafood Trade Show, Oct 25-28, <http://www.aqua-in-tech.com/papers.htm>.
- Ocampo V.L. 1994. Evaluación del efecto de la temperatura y del peso en el consumo de oxígeno del camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes 1900) (Decapoda: Penaeidae). Tesis para M. en C., IPN, CICIMAR, La Paz, BCS, México, pp. 63.
- Ocampo V. L., Villareal H., Vargas M., Portillo G. y Magallón F., 2000. Effect of dissolved oxygen and temperature on growth, survival and body composition of juvenile *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes). *Aquaculture Research*, 31, 167-171.
- Palacios, E., 1999. Caracterización fisiológica del agotamiento reproductivo y optimización de la reproducción del camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda: Penaeidae). Tesis Doctoral, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México. 193 pp.
- Palacios E., Ibarra A.M. y Racotta I.S., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 185, 353-371.
- Palacios E., Bonilla A., Pérez A., Racotta I.S. y Civera R., 2004. Influence of highly unsaturated fatty acids on the responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae to low salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 24, 201-215.
- Pascual C., Sanchez,A., Sanchez,A., Vargas-Albores,F., LeMoullac,G., y Rosas,C., 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637-650.
- Pascual C., Zenteno E., Cuzon G., Suárez J., Sánchez A., Gaxiola G., Taboada G., Maldonado T. y Rosas C., 2004., *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary proteins, *Aquaculture*, 239, 275-395.
- Pascual C., Sánchez A., Zenteno E., Cuzon G., Gaxiola G., Brito R., Gelabert R., Hidalgo E. y Rosas C., 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*,251,416-429.
- Paterson B.D., 1993, The rise in inosine monophosphate and L-lactate concentrations in muscle of live penaeid prawns (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) stressed by storage out of water. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 395-400.
- Péqueux A., 1995. Osmotic Regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.*, 15, 1-60.
- Perazzolo M.L., Gargioni R., Ogliari P. y Barroco A.M., 2002, Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214, 19-33.

- Pérez-Farfante y Kensley B., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the World. Key and diagnoses for the families and genera. *Memoires de Museum National D'Histoire Naturelle*, 175, 1-233.
- Pérez-Jar L., Rodríguez-Ramos T., Ramos L., Guerrero-Borrego Y. y Racotta I.S., 2006. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. *Aquaculture*, 252, 591-597.
- Pérez-Rostro C., Racotta I.S., Ibarra A.M., 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. *J. Exp.Mar. Biol.Ecol.*,302, 189-200.
- Petriella A.M. y Boschi E.E., 1997. Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. *Invest. Mar. Valparaíso*, 25, 135-157.
- Pickering,A.D., 1981. Introduction: The concept of biological stress. En: Pickering,A.D. (Ed.), *Stress and fish*, Academic Press, London, pp. 1-10.
- Pollero J. R., González B. M., e Irazú E.C., 1991. Lipid classes consumption related to casting and thermal stress in the shrimp *Machrobrachium Borelli*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Molec. Biol.*, 99, 233-238.
- Ponce-Palafox J., Martínez-Palacios C.A. y Ross L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone 1931. *Aquaculture* 157, 107-115.
- Poxton M., 2003. Water Quality. En: Lucas J.S. y Southgate P. (Eds.) *Aquaculture, farming aquatic animals and plants*, Blackwell Publishing, India, pp.
- Prosser L. 1991. En: *Environmental and metabolic animal physiology*, New York, Wiley-Liss. pp.
- Racotta I.S. y Palacios E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 351-356.
- Racotta I.S. y Hernández-Herrera R., 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 125, 437-443.
- Racotta I.S., Palacios,E., y Méndez,L., 2002. Metabolic responses to short and long-term exposure to hypoxia in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 35, 269-275.
- Racotta I.S., Palacios,E., Hernández-Herrera,R., and Carreño,D., 2003. Metabolic responses of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to environmental and handling stress. *Comp. Biochem.Physiol.* 134A, S27.
- Randall D., Burggren W., French K., 1997, En: *Fisiología Animal*, Ed. McGraw-Hill Interamericana, 736-765.
- Ratcliffe N.A., Brookman J.L. y Rowley A.F., 1991. Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Develop. Comp. Immunol.*, 15, 33-39.
- Ravindranath M. H., 1975, Effects of temperature on the morphology of hemocytes and coagulation process in the mole-crab *EMERITA (=HIPPA) ASIATICA*. *Biol. Bull.* 148, 286-302.
- Re D. A., Diaz F., Sierra E., Rodriguez J. y Pérez E., 2005. Effect of salinity and temperature on thermal tolerance of brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus* (Ives) (Crustacea, Penaeidae). *J. Ther. Biol.*, 30, 618-622.

- Rees J.F., Curé K., Piyatiratitivorakul S., Sorgeloos P. y Menasveta P., 1994. Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae: an experimental approach based on *Artemia* enrichment. *Aquaculture*, 122, 193-207.
- Renato J.C. y Yang J., 2007. Expresión patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, α -actin and β -actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Molec. Rep. Dev.* 74, 554-559.
- Reyes Becerril, 2008. Efecto de microdietas enriquecidas con levaduras secretoras de poliaminas, sobre el crecimiento, sobrevivencia y maduración del sistema inmunológico en larvas y juveniles de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Tesis doctoral, CIBNOR La Paz, B.C.S., México.
- Ritossa F., 1962. A new puffin pattern induced by temperatura shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571-573.
- Robertson L., Bray W., Leung-Trujillo J. y Lawrence A., 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aquacult. Soc.*, 18, 180-185.
- Roch P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172, 125-145.
- Rodríguez J., Le Moullac G., 2000. State of the art of immunologica tools and health control of prnaeid shrimp. *Aquaculture*, 191, 109-119.
- Rodríguez R.F., Bravo M., Gómez D.G., Rojas-Luna T., Jiménez G. y Balcazár J.L., 2003, Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura, II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, <http://www.civa2003.org>, 624-654.
- Roe J., 1954. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 212, 335-343.
- Rosas C., Sánchez A., Díaz-Iglesias E., Brito R., Martínez E., y Soto L.A. 1997. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae (PL₁₀₋₁₈) exposed to salinity changes. *Aquaculture*, 152, 259-272.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Arena L., Lemaire P., Soyoz C. y Van Wormhoudt A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolismo of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Biol. Endocrin.* 249, 181-198.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Le Priol Y., Pascual C., Rossignol J., Contreras F., Sánchez A. y Van Wormhoudt A., 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 259, 1-22.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Pascual C., Taboada G., Arena L. y Van Wormhoudt A. 2002. An energetic and conceptual modelo f the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 268, 47-67.
- Rosas C. , Cooper E.L., Pascual C., Britto R., Gelabert R., Moreno T., Miranda G., Sánchez A., 2004, Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild population (Crustacean, Penaeidae).
- Ross L.G. and Ross B., 1999. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. Blackwell Science, Oxford. 2ª ed. pp. 176.

- Sánchez A., Pascual C., Sánchez A., Vargas-Albores F., Le Moullac G., Rosas C., 2001, Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.
- Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Hernández-López J., Muhlia-Almazán A. y Yepiz-Plascencia G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol.*, 340, 184-193.
- Scandalios J. G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38, 995-1014.
- Scarpa J. y Vaughan D., 1998. Culture of marine shrimp *Penaeus vannamei* in fresh water. En: Book of abstracts of the World Aquaculture Society Meeting. Nevada, U.S.A. 473.
- Schmidt-Nielsen K., 1993, *Animal Physiology: Adaptation and environment*, Cambridge University Press, pp. 217-223.
- Simon C., 1982. Large-scale commercial application penaeid shrimp maturation technology. *J. World Maric. Soc.*, 13, 301-312.
- Seidman E.R. y Lawrence A.L. 1985. Growth, feed, digestibility and proximate body consumption of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. *J. World Maricul. Soc.* 16, 333-346
- Selvakumar S., P. Geraldine, 2005, Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: Acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70., *Comp. Biochem. Physiol.*, 140A:209-215.
- Silveira C. R., 2005. Índices hematológicos y celulares como boindicadores de estrés en *Oreochromis aureus* Steindachner (Tilapia) de cultivo. Tesis para M. en C., CIBNOR, La Paz, B.C.S., pp.
- Skinner D.M., 1985. Molting and regeneration. En: Bliss D. (Ed.) *The biology of crustacean*. Vol.9. Academic Press, N.Y., pp. 43-146.
- Smith P., Hiney M.P. y Samuelson O.B., 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 4, 273-313.
- Smith J. V., Brown H. J. y Hauton C., 2003. Immunosimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shell. Immunol.* 15, 71-90.
- Söderhäll K. y Cerenius L., 1992. Crustacean Immunity *Annu. Rev. Fish Dis.*, 3-23.
- Söderhäll K., Cerenius L. y Johansson M.W., 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates. En: Söderhäll K., Iwanaga S., Vasta G.R. (Eds.), *New directions in invertebrate immunology*. SOS Publications, Fair Haven, N.J., pp. 229-253.
- Somero G., 1997. Temperature relationships: from molecules to biogeography. En: Dantzler W. H. (Eds.). *Handbook of physiology*, sección 13: Comparative physiology, volume II, pp. 1391-1444.
- Song Y.L. y Hsieh Y.T., 1994. Immunoestimulation of tigre shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18, 201-209.
- Spees J. L., Sharon A. Chang, Mark J. Snyder, and Ernest S. Chang, 2002a. Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: equivalent temperature shifts elicit

- unique gene expression patterns for molecular chaperones and polyubiquitin, *Cell Stress Chaperones*; 7(1): 97–106.
- Spees J. L., Sharon A. Chang, Mark J. Snyder, and Ernest S. Chang, 2002b. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *Biol Bull.* 203, 331-337.
- Sritunyalucksana K. y Söderhäll K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53-69.
- Stryer L., 1995. En: *Biochemistry*. 4ª edición, W. H. Freeman and Company, New York, USA. pp.
- Stuck K.C., Watts S. A., Wang S. Y., 1996. Biochemical responses during starvation and subsequent recovery in postlarval white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Mar. Biol.* 125, 33-45.
- Tang K.F., Durand S.V., White B.L., Redman R.M., Pantoja C.R. y Lightner D.V., 2000, Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, 190, 203-210.
- Teshima S., Kanazawa A. y Okamoto H., 1977. Variations in lípido classes Turing the molt cycle of the prawn *Penaeus japonicus*. *Mar Biol.*, 39, 129-136.
- Todryk S., Melcher A., Hardwick N., Linardakis E., Bateman A., Colombo M., Stoppacciaro A. y Vile R., 1999. Heat-shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J. Immunol.* 163, 1398-1408.
- Tovar-Ramírez, D., 1998, Estudio de la actividad superóxido dismutasa y peroxidasa de *Microcoleus chthonoplastes* (Oscillatoriaceae: Cyanobacteria) CEPA SC7B9002-1 bajo estrés oxidativo, Tesis para M. en C., IPN, CICIMAR, La Paz, BCS, México, pp. 85.
- Tsing A., Arcieer J.M., Bréhélin M., 1989, Haemocytes of penaeids and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53:64-77.
- Van Aardt W.J. 1988. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni calma*, during anoxia and subsequent recovery. *Com. Biochem. Physiol. Part A: Physiology*, 9, 299-304.
- Van Handel E., 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.*, 11, 256-265.
- Vargas-Albore F., Guzmán M. y Ochoa J., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A, 299-303.
- Vargas-Albore F., 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.*, 3, 153-156.
- Vargas-Albore y Yepiz-Plascencia, 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*. 191, 13-21.
- Villareal H., Patricia Hinojosa y Jose Naranjo, 1994, Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus monodon*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 108A: 2/3, pp. 331-336.
- Wang F.I. y Chen J.C., 2006, The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* sbsp. *Damsela* under temperature stress. *Aquaculture*, 258: 34-41.

- Wang Y. C., Chang P. S. y Chen H. Y., 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defense of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Fsh & Shell. Immunol., 23, 1161-1177.
- Warner H.R., 1994. Superoxide dismutasa, aging and degenerative disease. Free Radical Biol. And Medicine, 3, 249-258.
- Wajsbrodt, N., Gasith, A., Krom, M.D., Samocha, T.M., 1990. Effect of dissolved oxygen and the molt stage on the acute toxicity of ammonia to juvenile green tiger prawn *Penaeus semisulcatus*. Environ. Toxicol. Chemistry 9, 497-504.
- Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591-625.
- Werner I., 2004. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalva). Mar. Environ. Res., 58, 803-807.
- Whiteley N.M. y El Haj A.J., 1997. Regulation of Muscle Gene Expression Over the Moults in Crustacea. Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Molec. Biol., 117, 323-331.
- Wu B.j., Kingston R.E. y Morimoto R.I., 1986. Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 629-633.
- Yepiz-Plascencia G., Vargas-Albores F. y Higuera-Ciapara I., 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. Aquaculture, 191, 177-189.
- Yoganandhan K., Thirupathi S. y Hameed S. S. 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in White spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture. 221, 1-11.
- Zar J. H., 1999. Data transformations. En: Biostatistical Analysis. 4^a ed., Prentice Hall, New Jersey, pp. 273 - 281.
- Zatta P., 1987. Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo-osmotic stress of *Carcinus maenas*, Mar. Biol., 96, 479-481.
- Zhang Q., Li F., Wang B., Zhang J., Liu Y., Zhou Q. y Xiang J., 2007. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression. Dev. Comp. Immunol., 31, 429-440.

XI. ANEXOS

ANEXO I. Estandarización de la técnica para cuantificación de la actividad de SOD en hemocitos y plasma.

Muestreo. Las pruebas de estandarización se realizaron utilizando juveniles de camarón que no habían recibido ningún tratamiento. A estos organismos se les extrajo hemolinfa (~500 μ l) a partir del seno hemolinfático ventral, utilizando una jeringa de 3 ml, que contenía previamente 1 ml de anticoagulante EDTA frío. La hemolinfa se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó (a 700 g , por 15 min. a 4°C). El plasma se separó y almacenó a -20°C, para su posterior análisis.

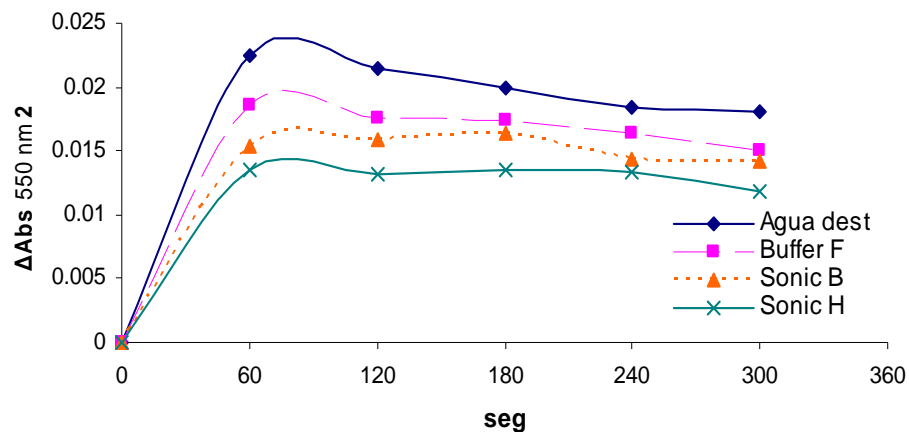
Procesamiento de muestras. Para procesar las muestras, se tomó como referencia el trabajo de Monari y colaboradores (2005). Sin embargo se probaron distintos procedimientos para lisar hemocitos, utilizando 2 camarones para cada procedimiento:

- Hemocitos resuspendidos en 300 μ l de agua destilada desionizada fría y agitados con ayuda de un vórtex.
- Hemocitos resuspendidos en 300 μ l de buffer fosfatos y agitados con vórtex, sin recibir ningún otro procesamiento.
- Hemocitos resuspendidos en 300 μ l de buffer fosfatos, se agitó en vórtex y las muestras fueron traspasadas a tubos de vidrio que fueron colocados en un baño de ultrasonido (sonicador Branson, modelo 2510) con hielo durante 10 minutos.
- Igual al procedimiento anterior pero en este caso se usó un homogenizador ultrasónico (Cole-Parmer Instrument, serie 4710) con punta de baja frecuencia, que se introdujo en la muestra por 40 segundos.

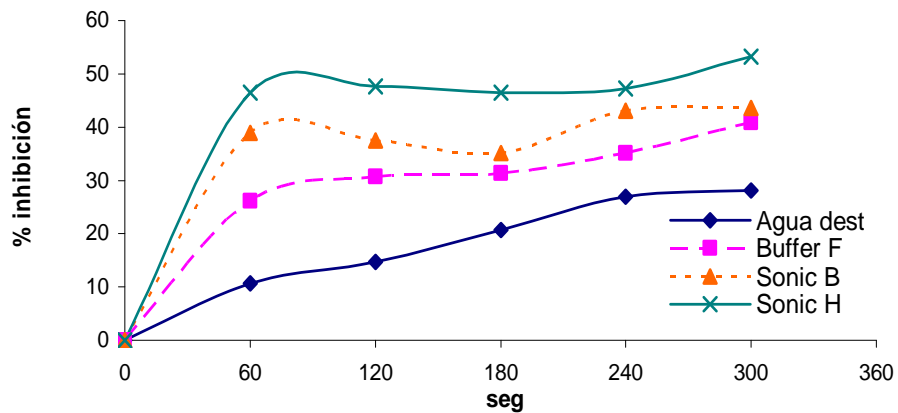
Análisis. Una vez que las muestras recibieron su respectivo tratamiento, fueron centrifugadas (a 12,000 g por 15 min a 4°C). Se recuperó el sobrenadante y se separó en 2 alícuotas; en una de ellas se realizó la determinación de proteínas totales como se describe en la sección de métodos analíticos. De la otra alícuota, se tomaron 10 μ l, se mezclaron con 1.970 ml de solución reactiva (xantina 0.108 mM, citocromo C 1.1mM, EDTA 10.7mM, buffer fosfatos 50 mM a pH 7.8) y se registró la cinética del cambio de absorbancia a 550 nm (Δ Abs₅₅₀1) en un espectrofotómetro (Beckman, modelo DU 640). Posteriormente se agregaron 20 μ l de solución XO (Δ Abs_{550 nm}XO = 0.025 \pm 0.0005) a la mezcla anterior, y nuevamente se tomó la lectura por 5 minutos para obtener el Δ Abs₅₅₀2. Durante este lapso de tiempo se observó en qué momento empieza a decaer la actividad enzimática, con el fin de establecer el tiempo ideal de lectura de las muestras. Este mismo proceso se siguió con las muestras de plasma que se separaron de los hemocitos. Finalmente se calculó el % de inhibición y las U mg^{-1} de proteína soluble como se menciona anteriormente en la sección de métodos analíticos.

Resultados. Las muestras de hemocitos que presentaron menor ΔAbs_{550} y por lo tanto un mayor porcentaje de inhibición, fueron aquellas sometidas a sonicación (baño de ultrasonido y homogenizado ultrasónico), como se indica en la figura I a y b respectivamente. Esto sugiere que el método más efectivo para lisar los hemocitos es la sonicación, en específico el homogenizado ultrasónico. Por lo tanto, se decidió utilizar uno de estos métodos de sonicación; el baño de ultrasonido para procesar las muestras de los bioensayos, ya que facilita el manejo de las mismas y evita su posible contaminación al no haber contacto directo con la muestra, como sería el caso del homogenizador.

Respecto al tiempo de lectura, se puede observar tanto en el caso de los hemocitos (Fig. I a), como en el de plasma (Fig. II), que la actividad de SOD y por lo tanto el ΔAbs_{550} , empiezan a mantenerse constantes o incluso a decaer entre el segundo 90 y 120 del lapso de lectura, iniciando la fase asintótica de la curva, lo cual indica que la velocidad de reacción ha disminuido, por lo que ya no es necesario registrar el cambio de absorbancia en las muestras por más tiempo. En base a esto, se determinó un lapso de 2 minutos, como el tiempo óptimo de lectura.



a. Incremento de la absorbancia a 550 nm (de la soluc. reactiva+muestra+XO)



b. Porcentaje de inhibición

Fig. I. Cinética de la actividad de SOD en un lapso de tiempo de 5 minutos en muestras de hemocitos de camarón que recibieron distintos procesos de lisado (medias de n=2): Agua destilada, buffer fosfatos, baño de sonicación (Sonic B) y homogenizado ultrasónico (Sonic H).

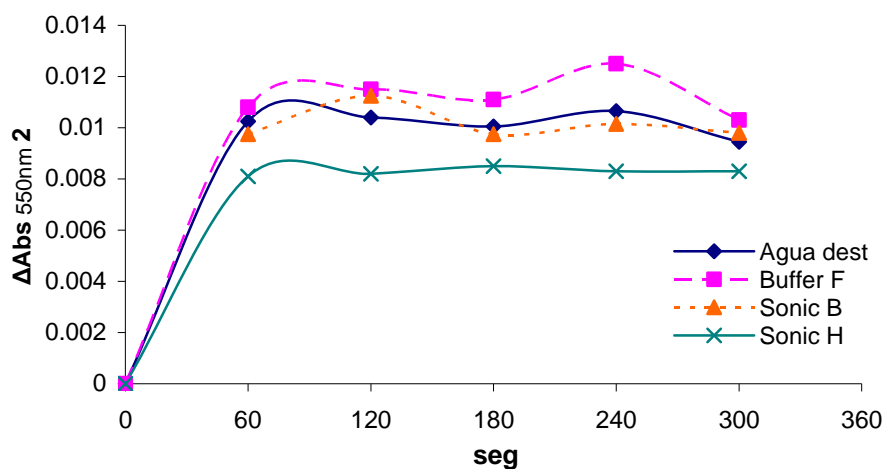


Fig. II. Cinética del cambio de absorbancia a 550 nm (soluc. reactiva+muestra+XO) en un lapso de tiempo de 5 minutos, en muestras de plasma de camarón, separadas a partir de hemocitos que recibieron distintos procesos de lisado (medias de n=2): Agua destilada, buffer fosfatos, baño de sonicación (Sonic B) y homogenizado ultrasónico (Sonic H).

A partir de los resultados obtenidos en estas pruebas, se estableció el baño de ultrasonido como el procedimiento más conveniente para lisar los hemocitos y el tiempo óptimo de lectura en 2 minutos para poder determinar la actividad de SOD en las muestras de los bioensayos.

ANEXO II. Comparación de respuesta al estrés entre grupos Control Absoluto (CA) y Control (C) del Bioensayo 1: 28 a 32°C

El grupo control absoluto (CA) fue utilizado únicamente en el primer experimento, con el fin de evaluar el estrés que pudiera representar el colocar a los camarones en los dispositivos experimentales y su manipulación durante el bioensayo. Con este objetivo se analizaron las diferencias entre el grupo de CA y el control experimental (C) por medio de un análisis de covarianza, utilizando el estadio de muda como covariable con el fin de analizar el efecto de la condición de estrés corrigiendo una posible influencia por el estadio de muda. Se utilizó el ANCOVA y no ANOVA bifactorial como en el caso de los demás resultados donde el CA contaba con un menor número de organismos y por ende no todos los estadios de muda estaban representados.

Tabla I. Comparación de las variables fisiológicas y tiempo de coagulación entre grupos control (CA y C).

	Control Absoluto <i>n=8</i>	Control 28°C <i>n=18</i>	<i>P</i>
Glucosa (mg dl ⁻¹)	19.47 ± 2.77	21.21 ± 1.42	NS
Lactato (mg dl ⁻¹)	7.98 ± 1.93	13.27 ± 2.70	NS
Triglicéridos (mg dl ⁻¹)	73.89 ± 11.96	70.60 ± 8.45	NS
Proteínas totales (mg ml ⁻¹)	78.87 ± 5.03	84.67 ± 2.79	NS
Hemocianina (mg ml ⁻¹)	65.18 ± 3.64	68.63 ± 3.43	NS
Osmolaridad (mmol kg ⁻¹)	796.00 ± 8.21	795.87 ± 7.59	NS
Tiempo de coagulación (seg)	18.83 ± 1.49	17.92 ± 2.04	NS

Los resultados del ANCOVA (por grupos) se muestran en la última columna. NS: no significativo.

Como se observa en la tabla I, las condiciones experimentales no afectaron significativamente las variables analizadas. Por lo tanto, el grupo CA no fue considerado en el primer experimento, ni evaluado en los demás bioensayos, debido a que no se presentaron diferencias significativas entre los grupos control (CA y C).

ANEXO III. Registro del peso de los organismos del bioensayo 1 y 2

No se registraron diferencias significativas entre grupos del mismo bioensayo. Sin embargo, el peso de los organismos del experimento 1, tanto del grupo control como de ST 32°C, resultó significativamente menor que el peso de los camarones del bioensayo 2.

Tabla II. Media del peso en gramos \pm error estándar de los camarones muestreados.

Grupo		<i>n</i>	Peso (g)
Control	Bioensayo 1	20	13.25 ^a \pm 0.49
ST 32°C	Bioensayo 1	15	12.78 ^a \pm 0.63
Control	Bioensayo 2	48	20.77 ^b \pm 0.49
ST 35°C	Bioensayo 2	50	20.76 ^b \pm 0.51

Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.001$) entre grupos.

ANEXO IV. Análisis de secuencias de Hsp70 de DNA plasmídico

Con el fin de cerciorarse que la secuencia parcial obtenida efectivamente correspondía a Hsp70, se amplificaron muestras preliminares de cDNA a partir mRNA de hepatopáncreas y hemocitos de distintos camarones. La amplificación se llevó a cabo por PCR, utilizando los oligos diseñados a partir de *D. labrax* y *P. olivaceus* como se indica en la sección de métodos 6.4.5. Los productos de la amplificación fueron clonados y secuenciados como se mencionó anteriormente. Una vez obtenidas las distintas secuencias parciales de Hsp70, se procedió a su alineación y comparación de homologías como se muestra en la Fig. III.

	1				50
HspA0.Hepatop.	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	CGAAGACGGT
Hsp.Hemoc.1	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	CGAGGACGGC
Hsp.Hepatop.a	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	CGAGGATGGC
Hsp.Hepatop.b	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	CGAGGATGGC
Hsp.Hemoc.2	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	CGAGGATGGC
Hsp.Hemoc.3	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	TGAAGACGGC
Consensus	GACGTGTCCA	TCCTGACCAT	cGAgGAcGGc
	51				100
HspA0.Hepatop.	ATCTTTGAGG	TCAAAGCCAC	GGCCGGAGAC	ACTCACCTGG	GCGGGGAAGA
Hsp.Hemoc.1	ATCCTCGAGG	TCAAAGCCAC	GGCCGGAGAC	ACTCACCTGG	GCGGAGAAGA
Hsp.Hepatop.a	ATCTTTGAAG	TCAAGTCCAC	AGCAGGAGAT	ACACATCTTG	GTGGGGAAGA
Hsp.Hepatop.b	ATCTTTGAAG	TCAAGTCCAC	AGCAGGAGAT	ACACATCTTG	GTGGGGAAGA
Hsp.Hemoc.2	ATCTTTGAAG	TCAAGTCCAC	AGCAGGAGAT	ACACATCTTG	GTGGGGAAGA
Hsp.Hemoc.3	ATCTTTGAGG	TGAAGTCCAC	TGCTGGAGAT	ACACATCTTG	GAGGGGAAGA
Consensus	ATCtTtGAgG	TcAAgtCCAC	.GC.GGAGAt	ACaCaTcTtG	G.GGgGAAGA
	101				150
HspA0.Hepatop.	CTTTGACAAC	CGCATGGTCA	ACCACTTTGT	GGAGGAATTC	AAGAGGAAAC
Hsp.Hemoc.1	CTTTGACAAC	CGCATGGTCT	ACCACTTTGT	GGAGGAGTTC	AAGAGGAAAC
Hsp.Hepatop.a	TTTCGACAAC	CGCATGGTCA	ACCACTTCAT	TGCTGAATTC	AAGCGCAAGT
Hsp.Hepatop.b	TTTCGACAAC	CGCATGGTCA	ACCACTTCAT	TGCTGAATTC	AAGCGCAAGT
Hsp.Hemoc.2	TTTCGACAAC	CGCATGGTCA	ACCACTTCAT	TGCTGAATTC	AAGCGCAAGT
Hsp.Hemoc.3	CTTTGACAAC	CGCATGGTCA	ACCACTTCAT	TGCTGAGTTC	AAGCGAAAGT
Consensus	cTTtGACAAC	CGCATGGTca	ACCACTTcaT	tGctGAaTTC	AAGcG.AAgT
	151				200
HspA0.Hepatop.	ACAAGAAGGA	CATCAGCCAG	AACAAGAGAG	CCTTGAGGAG	CCTGCGCACA
Hsp.Hemoc.1	ACAAGAAGAA	CATCAGCCAG	AACAAGAGAG	CCCTGAGGAG	CCTGCGCACA
Hsp.Hepatop.a	ACAAGAAGGA	CATCAGCGAC	AACAAGAGAG	CCGTCCGTCG	TCTGCGCACA
Hsp.Hepatop.b	ACAAGAAGGA	CATCAGCGAC	AACAAGAGAG	CCGTCCGTCG	TCTGCGCACA
Hsp.Hemoc.2	ACAAGAAGGA	CATTAGCGAC	AACAAGAGAG	CTGTCCGTCG	CCTGCGCACA
Hsp.Hemoc.3	ACAAGAAGGA	CATCAGCGAC	AACAAGAGAG	CTGTCCGTCG	CCTGCGCACA
Consensus	ACAAGAAGgA	CATcAGCgAc	AACAAGAGAG	CcgTccGtcG	.CTGCGCACA
	201	211			
HspA0.Hepatop.	GCTTGTGAGA	G			
Hsp.Hemoc.1	GCTTGTGAGA	G			
Hsp.Hepatop.a	GCTTGTGAGA	G			
Hsp.Hepatop.b	GCTTGTGAGA	G			
Hsp.Hemoc.2	GCTTGTGAGA	G			
Hsp.Hemoc.3	GCTTGTGAGA	G			
Consensus	GCTTGTGAGA	G			

Fig. III. Alineación de 5 secuencias parciales de Hsp70 obtenidas a partir de distintos tejidos. Hepatop.: hepatopáncreas, Hemoc.: hemocitos. HspA0. secuencia original a partir de la cual se diseñó la sonda Taq-man.

Oligos: 5' GACGTGTCCATCCTGACCAT, 3' CTGCGCACAGCTTGTGAGAG

Sonda: 3' CAAGAAGGACATCAGCCAGAACA, 5' CTGCGCACAGCTTGTGAG con marcador FAM, AGAGAG CCTTGAGGAG G apagador.

También se localizaron los oligos que flanquean la secuencia en cada uno de sus extremos, así como la secuencia de la sonda Taqman® (58 pb: de la base 1 a al 60) que se utilizó para cuantificar la expresión del gen Hsp70. Como se puede observar en la Fig. III, las secuencias de los distintos tejidos y organismos no son idénticas entre sí, ya que existen algunas inconsistencias en las bases nitrogenadas. Lo cual podría estar indicando que la secuencia utilizada corresponde a una porción del gen que presenta variabilidad entre los distintos tejidos y también entre individuos. Varias de estas inconsistencias coinciden en la región de la sonda que se mando fabricar para la cuantificación de la expresión del gen, lo cual podría afectar la eficiencia de amplificación de esta sonda, repercutiendo posiblemente en una subestimación en la expresión del gen. Por lo tanto, sería recomendable utilizar la secuencia consenso para diseñar una nueva sonda, o bien utilizar otra región del gen que presente menos variabilidad entre individuos y entre tejidos en camarón blanco.

Por otro lado, la posibilidad de contaminación de las muestras de cDNA de camarón con DNA de otra especie trabajada simultáneamente en el laboratorio, como es el pez *Mycteroperca rosacea*, queda prácticamente descartada, ya que al compararla con la secuencia parcial de Hsp70 de camarón mediante análisis Blast se encontró un porcentaje de homología del 86.6% (Fig. IV). Este porcentaje de homología resultó inferior al 100% de homología obtenido con *D. labrax* (Tabla 17). Lo cual sugiere que la alta homología de nuestra secuencia con la de algunas otras secuencias de peces óseos, es más por que el diseño de oligos que se basó en secuencias del gen Hsp70 de *D. labrax*, donde la región seleccionada del gen es menos variable que en camarón y no por una contaminación de muestras con *M. rosacea*.

```

86.6% identity in 149 residues overlap; Score: 109.0; Gap frequency: 0.0%

Hsp70cam,      2 GAAGACGGTATCTTTGAGGTCAAAGCCACGGCCGGAGACACTCACCTGGGCGGGGAAGAC
M.rosacea     22 GAGGATGGCATCTTTGAGGTGAAATCCACTGCAGGAGACACACACCTCGGTGGGGAGGAC
    ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
    ** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

Hsp70cam,     62 TTTGACAACCGCATGGTCAACCACTTTGTGGAGGAATTCAAGAGGAAACACAAGAAGGAC
M.rosacea     82 TTTGACAACCGGATGGTGAACCACTTTGTAGAGGAGTTTAAGAGAAAACACAAGAAGGAC
    ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

Hsp70cam,     122 ATCAGCCAGAACAAGAGAGCCTTGAGGAG
M.rosacea     142 ATCAGCCAGAATAAGAGAGCAGTGAGGAG
    ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

Fig. IV. Comparación y porcentaje de homología entre la secuencia obtenida de Hsp 70 de camarón (sin la secuencia de los oligos) y la de *Mycteroperca rosacea*