



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**EFFECTOS DEL TREMÁTODO DIGÉNEO *Cymatocarpus solearis* EN SU  
HOSPEDERO INTERMEDIARIO, LA LANGOSTA ESPINOSA *Panulirus argus***

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**BIOL. TOMÁS FRANCO BODEK**

**TUTORA PRINCIPAL:**

DRA. PATRICIA DOLORES BRIONES FOURZÁN  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

DR. ADOLFO GRACIA GASCA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DRA. ROSSANNA DEL PILAR RODRÍGUEZ CANUL  
CINVESTAV UNIDAD MÉRIDA

DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDÍA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y RECURSOS NATURALES, UNAM

DR. SERGIO CHÁZARO OLVERA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**CD. MX., JULIO, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**EFFECTOS DEL TREMÁTODO DIGÉNEO *CYMATOCARPUS SOLEARIS* EN  
SU HOSPEDERO INTERMEDIARIO, LA LANGOSTA ESPINOSA *PANULIRUS*  
*ARGUS***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**TOMÁS FRANCO BODEK**

**TUTORA PRINCIPAL:**

DRA. PATRICIA DOLORES BRIONES FOURZÁN  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

DR. ADOLFO GRACIA GASCA  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DRA. ROSSANNA DEL PILAR RODRÍGUEZ CANUL  
CINVESTAV UNIDAD MÉRIDA

DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDÍA  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y RECURSOS NATURALES, UNAM

DR. SERGIO CHÁZARO OLVERA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., JULIO, 2020**

## **Agradecimientos**

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.
- Al apoyo a Proyectos de Investigación PAPIIT-DGAPA-UNAM IN206117.
- Al CONACyT por la beca con solicitud 2018-000012-01NACF-08432.
- A mi tutora principal la Dra. Patricia Dolores Briones Fourzán por su tutela y paciencia durante la elaboración de este trabajo, así como por aceptarme como su estudiante de Maestría.
- A mi comité tutor integrado por el Dr. Adolfo Gracia Gasca, el Dr. Sergio Cházaro Olvera, la Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldía y a la Dra. Rossanna del Pilar Rodríguez Canul por sus aportes, ideas y revisiones durante la elaboración de este trabajo.
- A los integrantes del laboratorio de Ecología de Crustáceos de la UASA: Dr. Enrique Lozano Álvarez, M. en C. Amada Cecilia Barradas Ortiz, M. en C. Fernando Negrete Soto, Dr. Matteo Cazzanelli, Dra. Charlotte E. Davies y la Biol. Elisa Yahaira Chan Vivas por sus aportes intelectuales y su apoyo en la realización de este trabajo.
- Al Dr. Edén Magaña Gallegos por su ayuda durante el cuidado y manutención de los animales en cautiverio, así como en la realización de algunos experimentos.
- A los colaboradores de la Dra. Rodríguez: el M. en C. Juan Antonio Pérez Vega, laboratorista Irma Pérez García y M. en C. Nancy Herrera Salvatierra del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del CINVESTAV Mérida por sus aportes intelectuales, así como su apoyo para la realización de diversos experimentos.
- Al Ing. José Antonio López Portillo Hurtado por su apoyo en algunos experimentos.
- Al apoyo y amor de mi familia.

A mis abuelas Ruth y Elvira, mi mamá Claudia y mi hermana Daniela  
Las mujeres más sobresalientes e influyentes de mi vida.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	9
<b>Objetivos</b> .....	14
<b>Hipótesis</b> .....	15
<b>Material y métodos</b> .....	16
• Trabajo de campo.....	16
• índice de refracción de la hemolinfa.....	16
• Trabajo experimental y de laboratorio.....	17
• Efectos de <i>C. solearis</i> en la comunicación química entre langostas.....	18
• Respuesta de escape: capacidad de natación.....	22
• Tasa de Crecimiento.....	23
• Concentración de neuromoduladores.....	24
• Condición nutricional: Concentración de metabolitos.....	25
• Condición nutricional: Índice hepatosomático.....	26
• Densidad de hemocitos.....	26
• Medidas de validación de la determinación visual de la infección por <i>C. solearis</i> .....	27
• Mortalidad por la infección.....	28
• Determinación de presencia de PaV1.....	28
• Análisis estadísticos.....	29
<b>Resultados</b> .....	31
• Muestreo de langostas en Bahía de la Ascensión.....	31
• Efectos de <i>C. solearis</i> en la comunicación química entre langostas.....	32
• Respuesta de escape.....	33
• Tasa de crecimiento.....	36
• Concentración de neuromoduladores.....	37
• Estado nutricional.....	39
• Conteo de hemocitos.....	45

• Determinación de presencia de PaV1.....	46
• Sensibilidad y especificidad de la prueba visual .....	46
• Relación entre talla e intensidad de la infección.....	47
<b>Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>56</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>58</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>68</b>

## Resumen

La langosta espinosa *Panulirus argus* es uno de los recursos pesqueros más importantes de la región del Gran Caribe, por lo que resulta de interés conocer las posibles enfermedades y parásitos que pudieran afectar a sus poblaciones. El tremátodo digéneo *Cymatocarpus solearis*, cuyo hospedero definitivo es la tortuga caguama *Caretta caretta*, utiliza a *P. argus* como segundo hospedero intermediario. En general, los efectos de los parásitos en los segundos hospederos intermediarios tienden a aumentar las probabilidades de su transferencia trófica a los hospederos definitivos, pero esto no se ha explorado en el binomio *C. solearis/P. argus*. En el presente estudio se compararon diversas características fisiológicas, bioquímicas y conductuales entre cuatro grupos de langostas, tres de langostas parasitadas, separadas dependiendo de la intensidad de la infección (baja, media y alta), y un grupo de langostas no parasitadas. Se analizó de manera experimental si la infección con el tremátodo afecta la comunicación química entre langostas o la respuesta de escape ante un evento de depredación. Se observó que el parásito no afecta la comunicación química entre langostas; sin embargo, los tres grupos de langostas parasitadas tuvieron una respuesta de escape disminuida en comparación con las langostas sin parásitos, independientemente de la intensidad de la infección. También se comparó el índice hepatosomático, la densidad de hemocitos, y la concentración de glucosa, albúmina, colesterol y proteína total, así como de los neuromoduladores dopamina y serotonina, en la hemolinfa. No se encontraron diferencias significativas en el índice hepatosomático, densidad de hemocitos, las concentraciones de albúmina, colesterol, proteína total o dopamina entre los grupos de langostas. En cambio, las langostas altamente infectadas mostraron una concentración de glucosa significativamente menor que los otros tres grupos, y las langostas con una intensidad de infección media y alta mostraron una concentración de serotonina significativamente más alta que los grupos de langostas con baja infección y sin infección. Se determinó la sensibilidad de la prueba visual de la infección en 24.6% (IC95%: 17.6–33.2%), lo que sugiere que por cada langosta visiblemente parasitada hay otras tres parasitadas en lugares no evidentes a simple vista, mientras que la especificidad encontrada fue de 99.1% (IC95%: 94.5–99.9 %), lo que indica que los quistes de tremátodos visibles en *P. argus* son de *C. solearis*. Los resultados de este trabajo muestran que la infección por *C. solearis* está



asociada con una disminución de la efectividad de la respuesta de escape de las langostas infectadas al tiempo que aumenta la concentración de serotonina en la hemolinfa y disminuye la concentración de glucosa (en infecciones severas), lo que podría aumentar la probabilidad de depredación de los individuos infectados.

## Introducción

La langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* (Latreille, 1804), es un crustáceo decápodo que habita en el Océano Atlántico Noroccidental y la región del Gran Caribe desde Carolina del Norte (Estados Unidos) hasta Venezuela (Giraldes y Smyth, 2016), donde representa uno de los recursos pesqueros más importantes. Sin embargo, debido a la sobrepesca y el deterioro de las condiciones de su hábitat, las poblaciones de esta especie van en descenso (Briones-Fourzán y Lozano Álvarez, 2013).

Estas langostas poseen hábitos nocturnos y un ciclo de vida complejo con una fase larvaria planctónica que comprende 10 estadios de filosomas que tienen una duración de varios meses desde la eclosión hasta la metamorfosis a postlarva (Baisre, 1964; Goldstein et al., 2008). Los puerulos (postlarvas) regresan a la costa, donde se asientan en fondos someros y se refugian en la vegetación marina (pastizales marinos, macroalgas o manglares costeros), y se desarrollan a juveniles tempranos (6 a ~20 mm de longitud cefalotorácica, LC). Los juveniles tardíos (20 a 45 mm LC) cambian a refugios de tipo grieta donde puedan esconderse hasta desarrollarse en subadultos (50 a 80 mm LC), los cuales emigran al arrecife coralino donde maduran en adultos (80 a ~200 mm LC) (Briones-Fourzán et al., 2003; Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2013).

Las langostas espinosas son incapaces de formar su propio refugio y por lo tanto dependen de la disponibilidad de refugios pre-existentes para su supervivencia (Phillips et al., 2013). Las langostas *P. argus* presentan un comportamiento gregario mediado por señales químicas intra-específicas liberadas en la orina de coespecíficos que ya ocupan un refugio. Las señales químicas no solo reducen el tiempo de búsqueda de un refugio viable, sino que proporcionan información sobre la calidad del refugio (Ratchford et al., 1998; Horner et al., 2006, 2008; Phillips et al., 2013). Dicho comportamiento puede llevar a la agregación de varios coespecíficos en un mismo refugio. Con base en esas observaciones de comportamiento social es que se han desarrollado “casitas”, refugios artificiales que permiten albergar varias langostas y facilitan su captura, ya que éstas naturalmente buscan refugios de ese tipo (Briones-Fourzán et al., 2007).

La langosta *P. argus* representa un eslabón importante en las redes tróficas en ambientes costeros, ya que se alimenta de una amplia variedad de invertebrados marinos y algunas algas y a su vez es consumida por numerosas especies de peces óseos y cartilagosos, jaibas, pulpos, delfines y tortugas marinas (Cox et al., 1997; Briones-Fourzán et al., 2003, 2019). La complejidad de las redes tróficas suele ser aprovechada por distintos tipos de parásitos que poseen más de un hospedero a lo largo de su ciclo de vida y que se transmiten al hospedero definitivo por la vía trófica (Poulin y Cribb, 2002).

Aunque se conocen relativamente pocos parásitos que afecten a las langostas espinosas (Shields, 2011), se han estudiado extensamente los efectos y posibles mecanismos de transmisión del virus PaV1 (*Panulirus argus* Virus 1) (revisión en Behringer et al., 2011; Pascual-Jiménez et al., 2012). En cambio, existe muy poca información documentada sobre los efectos de otros parásitos. Uno de estos parásitos es el tremátodo digéneo *Cymatocarpus solearis*, el cual utiliza a las langostas *P. argus* como segundo hospedero intermediario (Gómez del Prado-Rosas, 2003). En el presente trabajo se estudiaron diversos aspectos sobre la infección de este macroparásito para comprender qué tipo de costo (alteración fenotípica) (Cézilly y Perrot-Minnot, 2010, Thomas et al., 2010), ya sea metabólico (alteración fenotípica del metabolismo) o de comportamiento (alteración fenotípica del comportamiento), pudiera tener sobre la langosta.

El tremátodo *Cymatocarpus solearis* es un digéneo de la familia Brachycoeliidae (Cheng y Provenza, 1960) con un ciclo de vida complejo que abarca múltiples hospederos consecutivos hasta llegar a su hospedero definitivo, la tortuga caguama (*Caretta caretta*) donde no se conoce su patología (Linton, 1910; Caballero y Caballero, 1959; Blair y Limpus, 1982; Grano-Maldonado y Álvarez-Cadena, 2010; Marangi et al., 2020), aunque también se ha registrado en las tortugas laúd (*Dermochelis coriacea*), verde (*Chelonia mydas*) y carey (*Eretmochelys imbricata*) (Threlfall, 1979; Werneck et al., 2015) con una amplia distribución que abarca países como México, Cuba, Brasil, e incluso se han reportado tortugas infectadas en la costa de Italia. Los tremátodos adultos liberan sus huevos a través de las heces de estas tortugas, los cuales son ingeridos por un primer hospedero intermediario cuya identidad

se desconoce, aunque en el caso de los digéneos suele ser un molusco gasterópodo. Al interior de este primer hospedero, los miracidios (fase larval) eclosionan de los huevos ingeridos y se reproducen asexualmente en el hemocele de su hospedero produciendo una o más generaciones de esporocistos que se alojan en los tejidos. Conforme van madurando, las células germinales de los esporocistos maduran y dan lugar a la formación de cercarias, que tienen la forma de un tremátodo inmaduro con una cola. Estas son cercarias natatorias, las cuales se liberan al agua. En esta fase de vida libre, se conocen como la fase infectiva y tienen un tiempo de vida de hasta 72 h. Durante este tiempo, las cercarias tienen que encontrar al segundo hospedero intermediario. Cuando lo encuentran, las cercarias penetran en el cuerpo del segundo hospedero intermediario, donde pierden la cola y se enquistan formando metacercarias (forma latente o quística), las cuales maduran. En este estadio son capaces de infectar a su hospedero definitivo. Esto ocurre cuando el segundo hospedero es consumido por el hospedero definitivo, en cuyo intestino el parásito alcanza la madurez sexual y completa su ciclo de vida (Chubb et al., 2009). Actualmente, los hospederos secundarios conocidos para *C. solearis* son el cangrejo ermitaño del Golfo Pérsico *Dardanus tinctor* (= *Pagurus tinctor*) (Dollfus, 1927), el cangrejo braquiuro *Maguimithrax spinosissimus* (= *Mithrax spinosissimus*) y la langosta espinosa del Caribe *P. argus* (Gómez del Prado-Rosas et al., 2003; Cruz-Quintana, 2012).

La infección en *P. argus* por metacercarias de *C. solearis* se describió por primera vez en la Bahía de la Ascensión, Quintana Roo, México (Gómez del Prado-Rosas et al., 2003). Más tarde, Briones-Fourzán et al. (2016) encontraron una prevalencia de la infección del 21% en la población de langostas de dicha Bahía, con una mayor probabilidad de infección en individuos subadultos y adultos que en juveniles, y con un promedio de 64 metacercarias por individuo infectado (aunque solo disectaron tres individuos). También observaron una mayor presencia de metacercarias en la musculatura del cefalotórax cerca de las bases de los pereiópodos y en los músculos abdominales (Briones-Fourzán et al., 2016). Los individuos infectados son identificables por los quistes cuando son visibles en la parte dorsal del primer somita abdominal, a través de la membrana artrodial translúcida entre el cefalotórax y el abdomen.

Los parásitos son capaces de afectar diversas características fenotípicas en sus hospederos, causando así un “síndrome de infección”. El costo de la infección se puede ver reflejado en variaciones en la tasa de crecimiento, tasa reproductiva, la condición nutricional del hospedero, respuestas inmunes del hospedero y concentraciones de neuromoduladores y/o metabolitos, entre otras (Anderson y May, 1978; Poulin y Cribb, 2002; Koehler et al., 2010; Cézilly et al., 2013; Herrera-Salvatierra et al., 2019). También está documentado que algunos parásitos son capaces de modificar el comportamiento de sus hospederos de una manera tal que facilita al parásito completar su ciclo de vida (Moore, 2002; Poulin et al., 2010). Por ejemplo, existen parásitos que modifican el comportamiento de su hospedero intermediario de tal forma que aumente la probabilidad de ser depredados por el hospedero definitivo (Lettini y Sukhdeo, 2010; Libersat et al., 2018).

Actualmente se desconocen los efectos que *C. solearis* pudiera tener sobre *P. argus*. Existen ejemplos de peces gregarios que evitan a coespecíficos infectados con metacercarias que alteran su aspecto o posiblemente sus señales químicas (Krause et al., 1999; James et al., 2008; Wisenden et al., 2009). Si un efecto similar ocurriera en *P. argus* se podría afectar el gregarismo en los refugios u otros aspectos de su vida social. Otra característica que podría ser afectada es la conducta del escape: al sentirse amenazadas, las langostas escapan flexionando los músculos abdominales rápidamente, resultando en un movimiento natatorio retrógrada para poder escapar de algún posible depredador (Atema y Cobb, 1980). Por tanto, es posible que un parásito alojado en la musculatura abdominal de *P. argus* cause que las langostas presenten un comportamiento de escape alterado y menos efectivo (Briones-Fourzán et al., 2016), como ha sido observado en la langosta noruega *Nephrops norvegicus* cuando es parasitada por un dinoflagelado del género *Hematodinium* (Stentiford et al., 2015); en camarones *Palaemonetes pugio* parasitados con un tremátodo microphallido (Kunz y Pung, 2004; Gonzalez, 2016), y en algunos peces parasitados por tremátodos bucefálicos (Rebolledo et al., 2014).

Además de los efectos antes mencionados, la infección con *C. solearis* también podría afectar la condición nutricional, química sanguínea y concentración de hemocianina o de hemocitos en la hemolinfa de las langostas (Stier et al., 2015; Davies et al., 2015), o causar

variaciones en las concentraciones de diversos neuromoduladores, como la serotonina (5-HT) y la dopamina (DA) (Overli et al., 2001; Pérez-Campos et al., 2012), que en conjunto podrían inducir comportamientos aberrantes que las llevaran a exponerse más a sus depredadores (Lafferty y Shaw, 2013). Los cambios en las concentraciones de neuromoduladores no ocurren hasta que las metacercarias han madurado y resultan infecciosas al hospedero definitivo (Cézilly et al., 2013). Este tipo de efectos pueden ser observados en la naturaleza sobre un amplio grupo de organismos, desde mamíferos hasta artrópodos, y son ocasionados por una amplia gama de parásitos. Por todo lo anterior, resulta importante determinar qué características de *P. argus* son afectadas por *C. solearis*, ya que incluso si los efectos de este tremátodo fueran sutiles podrían afectar su dinámica poblacional (Shields, 2011), lo que a su vez podría impactar tanto las pesquerías de esta especie, como la estructura de las comunidades de las que forma parte. .

## **Objetivos**

### ***Objetivo general:***

- Identificar si la presencia e infección por el tremátodo parásito *C. solearis* tiene algún efecto sobre su hospedero secundario, la langosta *P. argus*.

### ***Objetivos específicos:***

- Determinar si la infección por *C. solearis* altera la comunicación química intraespecífica en *P. argus*.
- Determinar si las langostas infectadas poseen una respuesta de escape alterada (capacidad natatoria).
- Determinar si la infección altera la condición nutricional y química sanguínea en langostas hospederas.
- Determinar si la infección altera las concentraciones de los neurotransmisores dopamina (DA) y serotonina (5-HT) de las langostas.
- Determinar si la tasa de crecimiento se ve alterada en langostas infectadas.
- Comparar la densidad de hemocitos entre individuos hospederos y no hospederos.

## **Hipótesis**

Si los tremátodos tienen un costo fisiológico y/o conductual en sus segundos hospederos intermediarios que pudiera aumentar su probabilidad de ser transmitidos al hospedero definitivo, entonces habrá diferencias en algunas características fisiológicas o conductuales entre langostas *P. argus* no infectadas e infectadas con el tremátodo *C. solearis*.



## **Material y métodos**

El trabajo comprendió dos partes: 1) un estudio de campo realizado en Bahía de la Ascensión que constó de dos muestreos en los que se midió el índice de refracción de luz de la hemolinfa tanto de langostas con quistes visibles de *C. solearis* como de las que no presentaron quistes visibles y 2) trabajo de laboratorio, en el cual se mantuvieron langostas vivas en estanques con agua de mar para realizar experimentos de señalización química y respuesta de escape, así como para determinar su tasa de crecimiento en cautiverio. Una vez realizados estos experimentos se tomaron muestras de hemolinfa para estimar la densidad de hemocitos, determinar la concentración de serotonina, dopamina, glucosa, albúmina, proteína total y colesterol en el plasma. Finalmente, las langostas fueron sacrificadas para determinar la intensidad de la infección (número de quistes por individuo infectado) y su índice hepatosomático.

### ***Trabajo de campo***

#### ***Índice de refracción de la hemolinfa***

El índice de refracción de la hemolinfa (IRH) en los crustáceos decápodos está directamente relacionado con la concentración de proteínas en el plasma (Lorenzon et al., 2011), por lo que este índice puede ser utilizado como un indicador de la condición nutricional de los animales de una manera rápida y poco invasiva (Oliver y MacDiarmid, 2001; Briones-Fourzán et al., 2009). Durante el mes de mayo de 2018, se realizó un muestreo de langostas en Bahía de la Ascensión (centrada en 19°35'27" N, 87°38'06" W), donde hay una importante pesquería local de *P. argus* basada en el uso de casitas. Una embarcación se utilizó para alcanzar las casitas localizadas en los campos de pesca de la bahía, de las cuales se extrajeron langostas utilizando redes de mano y buceo libre. Las langostas se midieron y fueron sexadas y revisadas para identificar la presencia de quistes de *C. solearis* (Gómez del Prado-Rosas, 2003) y de signos clínicos de infección por PaV1 (hemolinfa lechosa, visible a través de la membrana translúcida entre el cefalotórax y el abdomen (Shields y Behringer, 2004; Shields, 2011; Behringer et al., 2011; Huchin-Mian et al., 2013). Luego, a cada

individuo se le tomó una muestra de 100  $\mu$ L de hemolinfa utilizando una jeringa de insulina (BD ultra-fina, 0.5 ml) para medir su índice de refracción de la luz in situ utilizando un refractómetro de mano, con el objeto de determinar la condición nutricional de la langosta (Lorenzon, 2011; Lozano-Álvarez et al., 2017). Una vez terminado el análisis de cada individuo, todas las langostas se regresaron a su casita correspondiente.

En julio de 2018, se tomaron medidas y muestras adicionales de hemolinfa de la forma previamente descrita a langostas de talla comercial provenientes de la captura comercial de Bahía de la Ascensión, las cuales son desembarcadas vivas por los pescadores en el muelle de la comunidad pesquera Javier Rojo Gómez. Los valores del IRH obtenidos durante ambos muestreos fueron comparados entre langostas con y sin quistes visibles de *C. solearis* utilizando una prueba de rangos de Wilcoxon ya que los datos no se distribuyeron de manera normal.

### ***Trabajo experimental y de laboratorio***

La probabilidad de encontrar langostas infectadas con *C. solearis* aumenta con la talla de las langostas (Cruz-Quintana, 2012; Briones-Fourzán et al., 2016). Por tanto, para el trabajo experimental y de laboratorio se utilizaron langostas de talla comercial (>74 mm LC), las cuales provinieron de las capturas de langosta viva de las Bahías de la Ascensión y Espíritu Santo y fueron adquiridas de las Sociedades Cooperativas de Producción Pesquera “Pescadores de Vigía Chico” y “Cozumel”, respectivamente. Las langostas se mantuvieron en estanques de agua marina de 3 y 2 m de diámetro con flujo abierto de agua marina bombeada desde la laguna arrecifal de Puerto Morelos, por lo que las condiciones de temperatura y salinidad eran similares a las del entorno natural. Las langostas fueron alimentadas *ad libitum* tres veces a la semana con mejillones y jaibas, y los restos de comida eran removidos al día siguiente de ser alimentadas.

Las langostas se utilizaron en experimentos para determinar los efectos de la infección por *C. solearis* en la comunicación química intraespecífica y en la respuesta de escape, y se tomaron datos sobre la tasa de crecimiento. Al terminar los experimentos, se les extrajo una

muestra de hemolinfa de la cual se separó el plasma para poder realizar la cuantificación de diversos componentes de la hemolinfa, así como la concentración de dopamina, serotonina y su densidad de hemocitos. A las langostas una vez tomada la muestra de hemolinfa, se les cortó el tercio distal de un pleópodo para determinar su estado de muda en la escala de Drach observando al microscopio el grado de retracción de la cutícula (Lyle y McDonald, 1983) y se midió su longitud cefalotorácica (LC, en mm) utilizando un vernier. Después se colocaron en agua con geles congelados para disminuir su tasa metabólica con el objeto de sacrificarlas. Se utilizó una báscula electrónica para obtener el peso total de la langosta y después se separó el abdomen del cefalotórax utilizando un cuchillo. Se hizo una disección total de las partes corporales, las cuales fueron meticulosamente revisadas en busca de quistes de *C. solearis* en la musculatura, fácilmente identificables como pequeñas esferas blancas incrustadas en el músculo (Gómez del Prado-Rosas et al., 2003; Briones-Fourzán et al., 2016). Los quistes fueron contados y se seleccionaron algunos al azar para extraer las metacercarias e identificarlas con uso de un microscopio estereoscópico. El peso del hepatopáncreas húmedo se obtuvo extrayendo el hepatopáncreas del cefalotórax de las langostas y pesándolo en una microbalanza.

### ***Efectos de C. solearis en la comunicación química entre langostas***

Las langostas evitan utilizar refugios de los que se emanan señales químicas de alarma provenientes de coespecíficos recién muertos o heridos (Briones-Fourzán et al., 2008), y las langostas sanas evitan utilizar refugios que emanen señales químicas de coespecíficos clínicamente infectados con el virus PaV1 (Behringer et al., 2006; Candia-Zulbarán et al., 2015; Lozano-Álvarez et al., 2018). Por tanto, se desarrolló un experimento para evaluar si la infección con *C. solearis* afecta la comunicación química de las langostas. Para ello, se utilizaron los mismos laberintos en Y utilizados por Briones-Fourzán et al. (2006, 2008) y Candia-Zulbarán et al. (2015).

El laberinto en Y fue un estanque de fibra de vidrio que mide 2 m de largo x 0.8 m de ancho x 0.6 m de altura, cuyo final se encontraba dividido en dos mitades longitudinales divididas en partes iguales por un panel de 1 m de largo x 0.6 m de altura. Arriba de cada

división se encontraba un tanque cabecera de 0.6 x 0.5 x 0.5 m, de tal forma que había dos cabeceras por cada laberinto (Figura 1). Las cabeceras estaban separadas físicamente de los laberintos excepto por un tubo que permitía el flujo de agua de estos tanques al laberinto en Y. Los laberintos en Y así como las cabeceras eran opacos para impedir que los individuos pudieran utilizar señales visuales y al encontrarse las cabeceras separadas de los laberintos los individuos tampoco podían utilizar vibraciones o sonidos para identificarse. En el extremo del laberinto más alejado de los estanques cabecera había un desagüe que permitía la salida del agua, así como una malla semicircular que impidió que las langostas buscaran refugio en las esquinas del inicio del laberinto. En cada brazo del laberinto se encontraban refugios idénticos dispuestos de tal forma que el agua proveniente de una de las cabeceras caía en la parte posterior de un refugio. Así, uno de los refugios recibió agua marina con señales químicas de una langosta estímulo mientras que el otro refugio solo recibió agua marina de la cabecera control. Se bombeó agua de mar hacia cada una de estas cabeceras con un flujo de aproximadamente 2 L min<sup>-1</sup>. Este flujo se midió 1 hora antes de iniciar el experimento y luego se volvió a medir una vez concluido el experimento.

Al inicio de cada corrida (repetición individual del experimento) experimental se eligió al azar una cabecera de cada laberinto lanzando una moneda. En dicha cabecera, se colocó una langosta emisora de señales químicas (“estímulo”) que también fue elegida al azar, mientras que en la otra cabecera sólo corrió agua de mar a modo de control. La langosta estímulo podía estar o no estar infectada por *C. solearis* dependiendo del tratamiento. Después de colocar a la langosta estímulo en la cabecera se eligió otra langosta (“langosta focal”), también al azar, pero proveniente de un estanque distinto al estanque del cual se eligió la langosta estímulo, para evitar que esta langosta pudiera reconocer al estímulo por sus señales químicas (Shabani et al., 2009). La langosta focal se colocó al inicio del laberinto dentro de un cilindro de malla para evitar que el individuo se moviera por el laberinto y se le dejó aclimatándose durante 2 h. Pasado este tiempo se removió la parte frontal del cilindro de malla cuidadosamente para no perturbar al individuo focal y se le dejó en libertad de moverse por el laberinto durante toda la noche. A la mañana siguiente se observó cuál de los dos refugios eligió el individuo focal, considerando solamente langostas que se encontraron dentro o arriba de un refugio o a una distancia de hasta una longitud corporal del refugio

(Candia-Zulbarán et al., 2015). Las langostas que se encontraron caminando por el laberinto o lejos de algún refugio fueron excluidas. Se consideró como “atracción” a la elección del refugio con flujo proveniente de la cabecera donde se encontraba la langosta estímulo y como “evasión” a la elección del refugio con flujo proveniente del estanque cabecera control. Después de cada experimento, las langostas fueron sexadas y se les midió la longitud cefalotorácica (LC). A las langostas focales se les cortó una pequeña porción de un pleópodo para determinar su estado de muda por observación al microscopio (Lyle y MacDonald, 1983).

El experimento constó de cuatro tratamientos en los que se varió la condición de langostas estímulos vs focales:

- Estímulo sano (sin tremátodos) vs. focal sano (tratamiento SS).
- Estímulo sano vs. focal parasitado (con tremátodos) (tratamiento SP).
- Estímulo parasitado vs. focal sano (tratamiento PS).
- Estímulo parasitado vs. focal parasitado (tratamiento PP).

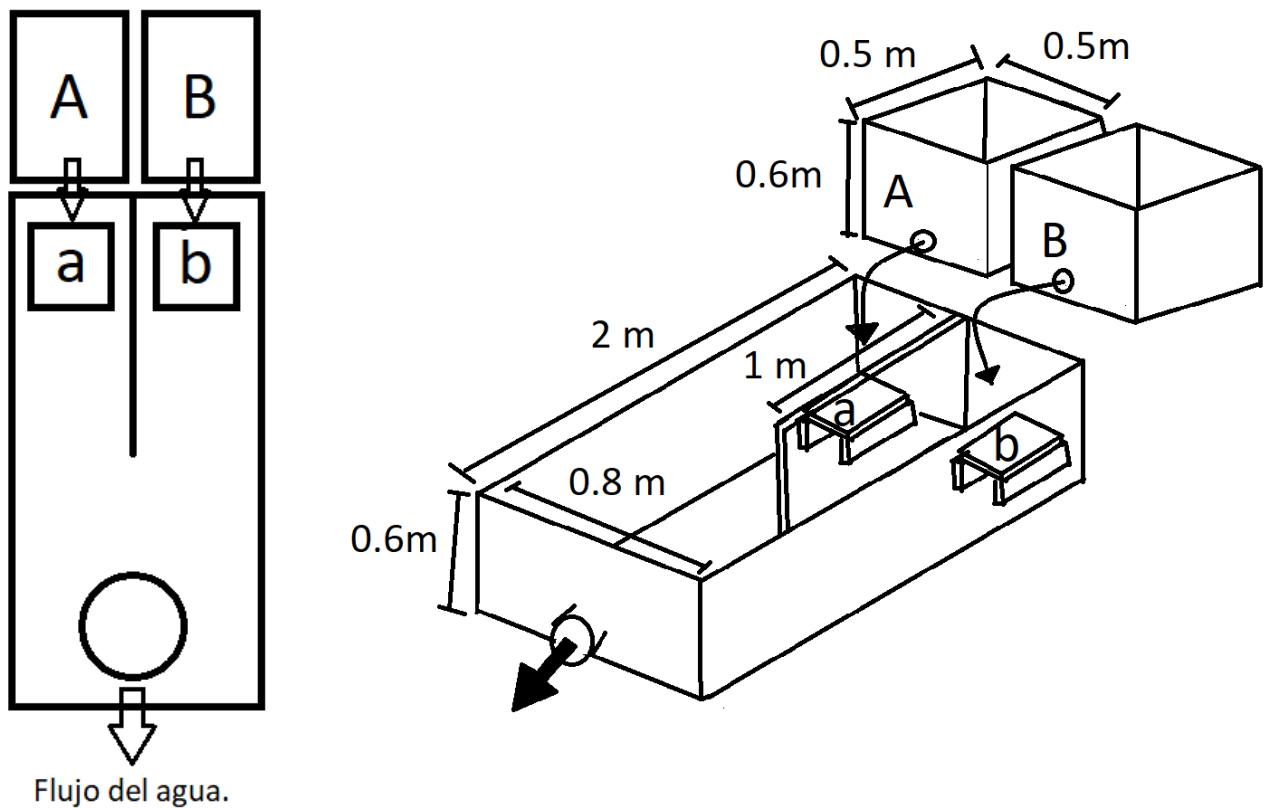


Figura 1: Diagrama del laberinto en Y (2 m x 0.8 m x 0.6 m). Las letras A y B representan las cabeceras (0.6 x 0.5 x 0.5 m) en donde se coloca a la langosta estímulo (emisora de señales). a y b representan los refugios en los cuales la langosta focal (recibidora de señales) puede elegir. Las flechas direccionales representan la dirección del flujo del agua.

Los resultados de cada tratamiento se analizaron de manera similar a lo descrito por Candia-Zulbarán et al. (2015) utilizando una prueba binomial de dos colas para determinar si las respuestas a la elección de refugio difirieron o no del azar considerando cada “atracción” como éxito en dicha prueba. Los resultados de los cuatro tratamientos fueron posteriormente sometidos a un análisis de tabla de contingencia con  $\chi^2$ . No se utilizaron hembras ovígeras en este experimento y se excluyeron resultados de laberintos en los cuales la diferencia entre el flujo inicial y final fue mayor a  $0.5 \text{ L min}^{-1}$  (Candia-Zulbarán et al., 2015), o en los que los individuos focales no se encontraron en intermuda (estadios C o D<sub>0</sub> en la escala de Drach: ver Lyle y MacDonald, 1983). Durante las corridas experimentales no se alimentó ni a los individuos focales ni a los emisores.

## ***Respuesta de escape: capacidad de natación***

Las langostas responden a una amenaza directa por medio de la natación retrógrada que resulta de rápidas flexiones del abdomen (Atema y Cobb, 1980). Para determinar si la infección con *C. solearis* afecta la capacidad de natación (respuesta de escape) de *P. argus* se utilizó un canal de 5 m de largo y 40 cm de ancho, con un nivel de agua de 50 cm, marcado en cada centímetro utilizando una cinta métrica a lo largo de cada lado del canal. Se midieron tres variables del comportamiento de escape utilizando el protocolo diseñado por Briones-Fourzán et al. (2006): retraso al escape (tiempo de reacción entre un estímulo de depredación y el inicio del escape, en s), duración del evento de escape (en s) y distancia recorrida (en m) durante un evento de natación. Con estos datos, se estimó también la velocidad de natación (m/s) y la aceleración ( $m/s^2$ ), la fuerza (en N) y el trabajo ejercido al nadar (en J) por los individuos.

El canal fue dividido utilizando una compuerta opaca guiada por un riel colocado a 50 cm de uno de los extremos del canal creando así un área de aclimatación de 50 cm donde se colocó al individuo seleccionado para el experimento. La compuerta se encontraba amarrada a una cuerda que colgaba de una polea situada directamente sobre el canal, de tal forma que fuera posible levantar la compuerta de manera súbita al tirar de esta cuerda. Asimismo, se colocó otra tabla opaca por encima del área de aclimatación para evitar perturbar al individuo mediante estímulos visuales externos al canal.

En el experimento en total se utilizaron 80 langostas y se usó una langosta por corrida. Al inicio de cada corrida se colocó a un individuo en el área de aclimatación con la cola de frente a la compuerta de tal forma que pudiera iniciar fácilmente el escape a lo largo del canal cuando se abriera la compuerta y se simulara el ataque de un depredador. A este individuo se le permitió aclimatarse durante un minuto. Una vez pasado ese lapso se simuló el ataque de un depredador que consistió en intentar atrapar a la langosta rápidamente con una mano. Simultáneamente se tiró de la cuerda sujeta a la compuerta permitiendo al individuo escapar por el canal. Dos personas tomaron el tiempo utilizando cronómetros de mano; una midió (1) el tiempo desde que se simuló el ataque hasta la finalización del evento natatorio (un evento

natatorio inicia con el primer coletazo y termina una vez que la langosta vuelve a tocar el fondo del canal o se intenta agarrar de las paredes del mismo), mientras que la segunda midió (2) el tiempo a partir de que la langosta escapó por la compuerta hasta la finalización del evento natatorio. El tiempo de reacción se obtuvo sustrayendo el tiempo (2) del tiempo (1). Se invalidaron corridas en las cuales la langosta no nadó (caminó por el canal) o cuando la langosta dio vuelta y escapó en dirección contraria a la compuerta. De este experimento se excluyeron hembras ovígeras, así como individuos que no se encontraran en intermuda.

### ***Tasa de Crecimiento***

Muchas enfermedades interfieren con la tasa de crecimiento de los individuos afectados (Sousa, 1983; Gérard y Theron, 1997; Lettini y Sukhdeo, 2010), ya que la energía que el individuo normalmente utilizaría para crecer es canalizada a combatir la infección o a compensar los problemas que ésta causa.

La langosta espinosa muda su exoesqueleto durante un evento de ecdisis para poder crecer. El número de eventos de muda tiende a disminuir conforme las langostas crecen, y la tasa de crecimiento depende de la temperatura del agua, el tamaño del animal (animales más grandes tienen una tasa de crecimiento menor), el sexo y las heridas que tengan o apéndices que les hagan falta y deban regenerar (Travis, 1954; Hunt y Lyons, 1986; Briones-Fourzán y Lozano-Álvarez, 2003). En *P. argus*, el ciclo de muda se interrumpe por completo cuando sufren una severa infección por PaV1 (Herrera-Salvatierra et al., 2019), pero se desconoce si otras infecciones podrían tener un efecto similar.

A cada langosta mantenida en cautiverio se le dio seguimiento a su crecimiento tomándole una foto y midiendo su longitud cefalotorácica (LC) después de un periodo de dos semanas de aclimatación y asignándole un número individual. La fotografía permitió volver a identificar al individuo más adelante, debido a que los patrones de manchas en el cefalotórax se conservan entre cada muda (MacDiarmid et al., 2005). Los estanques fueron revisados diariamente y cada muda encontrada fue removida y usada para identificar al individuo que mudó. Al menos 20 días después de la muda se utilizó un vernier para volver a medir la LC



del individuo. Transcurrido ese tiempo, el exoesqueleto ya se encuentra completamente endurecido (Travis, 1954). La tasa de crecimiento semanal se estimó como:  
 $LC \text{ final} - LC \text{ inicial} / \text{número de días transcurridos} \times 7.$

### ***Concentración de neuromoduladores***

La dopamina (DA, CAS: 51-61-6) y la serotonina (5-HT, CAS: 50-67-9) son dos neuromoduladores involucrados en el comportamiento animal. La serotonina en crustáceos ha sido identificada como un neuromodulador importante de las interacciones agonísticas entre coespecíficos (Kravitz, 1988; Huber et al., 1997; Edward y Kravitz, 1997; Alekseyenko y Kravitz, 2015). La infección por algunos parásitos puede afectar la concentración de estos neuromoduladores y modificar el comportamiento de los animales (Libersat et al., 2018), por ejemplo, aumentando su exposición a depredadores al modificar su patrón de movimientos, lo que a su vez incrementa las probabilidades del parásito de llegar al hospedero definitivo y completar su ciclo de vida (Pérez-Campos et al., 2012; Lafferty y Shaw, 2013; Libersat et al., 2018).

La concentración de los neurotransmisores fue determinada extrayendo una muestra de 1 ml de hemolinfa que se disolvió 2:1 en SIL para evitar su coagulación (Kwok y Tobe, 2006). El SIL es una solución isotónica para langosta que utiliza EDTA (ácido etilendiaminotetracético, CAS 60-004) como anticoagulante debido a sus propiedades quelantes (NaCl 350 mM, KCl 10 mM, buffer HEPES 10 mM, EDTA-Na 10 mM, pH 7.3, osmolaridad aproximada de 790 mOsm/kg). La hemolinfa se extrajo insertando la aguja de una jeringa de 3 ml conteniendo el SIL entre el cuarto y quinto par de pereiópodos y fue inmediatamente centrifugada a 4000 g para separar el plasma. Una vez obtenido, el plasma fue congelado a -20°C. Un mes después, las muestras fueron transportadas en hielo al CINVESTAV-Mérida, donde se procesaron.

Las muestras se procesaron utilizando el kit de cuantificación de dopamina ALPCO (17-DOPHU-E01.1) siguiendo los lineamientos en las instrucciones del fabricante para llevar a cabo la reacción. La cuantificación de serotonina fue realizada utilizando muestras obtenidas

de manera similar utilizando el kit de cuantificación de serotonina DRG Serotonin FAST ELISA (EIA-5061), también siguiendo las instrucciones del fabricante. Las lecturas de absorbancia para ambos neuromoduladores se tomaron a 25°C a una longitud de onda de 450 nm y se les restó el valor de referencia tomado a 620 nm a cada muestra. Las concentraciones de los neuromoduladores fueron calculadas graficando su respectiva curva de calibración usando la absorbancia obtenida de su estándar correspondiente (eje Y, linear) contra sus respectivas concentraciones (eje X, logarítmico) y se extrapolaron los valores de cada muestra usando una regresión no linear incluida en Prism 8 (GraphPad).

### **Condición nutricional: Concentración de metabolitos**

Las infecciones por parásitos pueden tener un costo energético sobre sus hospederos, derivado de la energía que estos utilizan para combatir dicha infección, y que puede verse reflejado en la condición nutricional del hospedero (Ciaramella et al., 2014; Herrera-Salvatierra et al., 2019). La concentración de diferentes componentes bioquímicos de la hemolinfa fue medida y comparada entre langostas con tremátodos y sin tremátodos para determinar el posible costo energético de una infección por *C. solearis* sobre su langosta hospedera. Los componentes fueron: proteínas totales, colesterol, glucosa y albúmina.

Se utilizaron kits colorimétricos de la marca SPINREACT (Glucose-LQ 41010, Albumine 1001020, Total protein 1001291 y Cholesterol-LQ 41020) con ligeras modificaciones a los protocolos del fabricante. Las lecturas se realizaron utilizando un espectrofotómetro y placas de 96 pocillos, por lo que el protocolo se modificó utilizando 200 µl del reactivo del kit y 10 µl de la muestra diluida en SIL para las reacciones de colesterol y glucosa mientras que las concentraciones de proteína total y albúmina fueron obtenidas utilizando 245.5 µl del reactivo del kit y 2.5 µl de la muestra en SIL. Las lecturas de colesterol fueron tomadas a una longitud de onda de 505 nm después de incubar la reacción durante 5 minutos a 37°C, mientras que las de glucosa fueron medidas a una longitud de onda de 505nm después de ser incubadas durante 10 minutos a 37°C según la especificación del kit. La concentración de albúmina fue medida a 630 nm mientras que la proteína total a 540 nm sin estas requerir un tiempo de incubación. Puesto que las concentraciones de los metabolitos en la hemolinfa son influidas

por el estado de muda de los animales (Briones-Fourzán et al., 2003; Ciaramella et al., 2014; Herrera-Salvatierra et al., 2019), se utilizaron en el análisis estadístico solamente las muestras de individuos que se encontraban en intermuda (estadios C o D<sub>0</sub> en la escala de Drach) (Lyle y McDonald, 1983) cuando fueron tomadas las muestras.

### **Condición nutricional: Índice hepatosomático**

En los crustáceos, el hepatopáncreas es una glándula digestiva, similar al hígado en mamíferos, compuesta de numerosos túbulos pequeños en los cuales la comida ingerida termina de ser digerida y sus productos son absorbidos a la hemolinfa. También funciona como reservorio energético en períodos de ayunas (Gray, 1992). Por ello, el índice hepatosomático (IH) representa un indicador del estado de la condición nutricional en langostas, incluyendo *P. argus* (Dall, 1974; Briones-Fourzán et al., 2003, 2009; Gutzler y Butler, 2017). Para obtener el IH, las langostas fueron disectadas y se les extrajo el hepatopáncreas, que se identifica por ser un órgano grande de color amarillo-verdoso localizado en el cefalotórax de los animales. Una vez extraído, el hepatopáncreas se pesó en una microbalanza y el IH se calculó como: peso húmedo del hepatopáncreas/peso total de la langosta x 100.

### **Densidad de hemocitos**

El sistema inmune de los crustáceos se basa principalmente en su eficiente sistema innato, ya que carecen de memoria inmunológica, y está regido principalmente por los hemocitos, cuya eficiencia radica en su efecto inmunomodulador. En este tipo de respuesta inmune se utilizan varios tipos de hemocitos, lo que aumenta su densidad en la hemolinfa (Li et al., 2006), y depende de la cascada de señalización de la enzima fenoloxidasa, la cual culmina en la encapsulación del invasor en melanina y hemocitos (Loker, 1994; Johansson et al., 2000; Bryan-Walker et al., 2007). Si la infección por *C. solearis* dispara este tipo de reacción inmunológica en *P. argus* se podrían encontrar diferencias en la densidad de hemocitos entre las langostas no infectadas y las infectadas.

La densidad de hemocitos en la hemolinfa se estimó resuspendiendo en SIL el pellet celular obtenido durante la extracción de plasma para la cuantificación de neurotransmisores. Del pellet celular resuspendido se tomó una alícuota de 20 µl y se colocó en una cámara de Neubauer donde se contaron los hemocitos. La estimación de hemocitos se llevó a cabo utilizando la siguiente ecuación:

$$(\text{Conteo total de hemocitos} / 8) \times \text{factor de dilución} \times 10000 = \text{Hemocitos} / \text{ml}$$

donde 8 representa el número de cuadrantes en la cámara de Neubauer y el factor de dilución varió entre 1 y 4, dependiendo de cada muestra. De este conteo se excluyeron individuos que no se encontraban en intermuda durante la extracción.

### ***Medidas de validación de la determinación visual de la infección por *C. solearis****

La única forma actualmente de identificar langostas infectadas con *C. solearis* sin dañar al individuo es buscando quistes en la musculatura abdominal, observando a través de la membrana artrodial entre el primer somita abdominal y el cefalotórax (Gómez del Prado-Rosas et al., 2003; Briones-Fourzán et al., 2016). Este método probablemente subestima la cantidad de langostas que realmente se encuentran infectadas en una población, ya que es posible que tengan quistes en lugares no visibles, como en los músculos de las coxas (Briones-Fourzán et al., 2016). Por ello es necesario realizar medidas de validación de la determinación visual en campo comparándola con una prueba más precisa (“estándar de oro”).

Las medidas de validación se basan en dos criterios; la sensibilidad y la especificidad (Pestal et al., 2003). La sensibilidad de una prueba mide la proporción de positivos correctamente identificados (en este caso la proporción de langostas infectadas por *C. solearis*), mientras que la especificidad mide la proporción de los negativos correctamente identificados. En el caso de la infección por *C. solearis*, se consideró como estándar de oro la determinación de la presencia de quistes por medio de la disección total del individuo parasitado. Para estimar la sensibilidad de la prueba visual se dividió el número de langostas

clasificadas como infectadas visualmente entre el número total de langostas clasificadas como infectadas después de ser disectadas. La especificidad de la prueba se estimó dividiendo el número de langostas sin tremátodos entre el número de langostas sin tremátodos más el número de falsas identificaciones positivas (Pestal et al., 2003). Los intervalos de confianza al 95% de las proporciones fueron calculados utilizando el método de Wilson con continuidad de corrección (Newcombe, 1998).

### ***Mortalidad por la infección***

Las metacercarias permanecen en el cuerpo de los hospederos infectados a lo largo de su vida, pero su presencia en el organismo no impide que este se siga re-infectando. Por ello, los hospederos van acumulando metacercarias mientras más tiempo vivan, si las condiciones para que ocurra la infección se dan. Si los parásitos se acumulan en el cuerpo del hospedero conforme este crece sin aumentar su mortalidad, se esperaría encontrar una relación lineal positiva entre la cantidad de metacercarias enquistadas y el tamaño del hospedero (Koehler et al., 2010). Por el contrario, si a mayor intensidad de parásitos mayor mortalidad, entonces la relación sería negativa. Pero si la relación es curvilínea, esto puede indicar que la intensidad de la infección aumenta con la talla del hospedero hasta cierto punto, pero luego disminuye debido a la pérdida de los individuos altamente infectados de la población (Anderson y May, 1978; Latham y Poulin, 2002; Koehler et al., 2010). Se probó una regresión lineal y una regresión polinomial de segundo orden (cuadrática) para determinar si había algún tipo de relación entre la intensidad de la infección con metacercarias de *C. solearis* y el tamaño de las langostas hospederas.

### ***Determinación de la presencia de PaV1***

Una posible coinfección de *C. solearis* y PaV1 podría alterar los resultados de las características analizadas, por ello las langostas experimentales fueron sometidas a ensayos de PCR para determinar la presencia del ADN de PaV1 en su sistema. A todos los individuos se les limpió el exoesqueleto utilizando EtOH al 70% y se les tomó una muestra de hemolinfa de aproximadamente 300 µl entre el cuarto y quinto par de pereiópodos, utilizando jeringas

de 1ml. La muestra fue resuspendida inmediatamente en 500  $\mu$ l de EtOH absoluto y guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El ADN fue extraído utilizando un kit (Promega Wizards Genomic DNA Purification Kit A1125), modificando el protocolo para muestras suspendidas en etanol. La extracción fue confirmada utilizando electroforesis en gel de agarosa 1.5%, tinción utilizando GelGreen (Biotium) y revelado usando un transiluminador de luz UV. El ADN se amplificó utilizando los cebadores 45aF y 543aR (Montgomery-Fullerton et al., 2007) en volúmenes de 10  $\mu$ l, utilizando 0.6X buffer de carga Promega, 0.8mM de cada oligonucleótido, 2.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4mM de cada dNTP (Promega), 0.03 U Taq DNA polimerasa (Promega). Las condiciones de ciclaje térmico fueron un ciclo a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 10 min seguido por 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 s,  $63^{\circ}\text{C}$  por 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  por un minuto y  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min (Candia-Zulbarán et al., 2015). De igual manera se utilizó una electroforesis en gel de agarosa de 1.5% y tinción utilizando GelGreen, la región amplificada de 499 pares de bases fue determinada utilizando un control positivo de muestras conocidas infectadas con PaV1 y como control negativo se utilizó agua destilada estéril.

### ***Análisis estadísticos***

Análisis exploratorios mostraron una alta dispersión en los resultados de casi todas las variables medidas en los individuos infectados. Por esta razón, y porque los efectos de un parásito pueden variar con la intensidad de la infección (número de parásitos por individuo infectado) (Hansen y Poulin, 2005; Koehler y Poulin, 2010), los resultados fueron analizados separando a las langostas en cuatro grupos arbitrarios dependiendo de la intensidad de la infección, con la excepción de los estudios de muestreo de campo y los experimentos de laberintos en Y. Estos grupos fueron: langostas no infectadas (0 quistes), langostas levemente infectadas (con 1 a 10 quistes), langostas moderadamente infectadas (11 a 30 quistes) y langostas altamente infectadas ( $>30$  quistes). La elección de estos grupos arbitrarios se realizó tomando en cuenta que esta separación daría tamaños de muestra similares entre las poblaciones (Kunz y Pung, 2004). Los resultados, con la excepción del experimento de señalización química, se analizaron con pruebas no paramétricas de Kruskal-

Wallis utilizando los paquetes *stats* (v. 3.1.6, R Core Team, 2019) y *Hmisc* (v. 4.2-0, Harrel, 2019) en la plataforma R. (R Core Team, 2019). Para realizar pruebas *post-hoc* se utilizó el software Statistica v.8 (StatSoft, Inc., USA).

## Resultados

### ***Muestreo de langostas en Bahía de la Ascensión***

Durante los dos muestreos realizados en Bahía de la Ascensión se tomaron muestras de hemolinfa de 190 individuos, de los cuales se excluyeron 45 debido a que la observación de sus pleópodos al microscopio mostró que no se encontraban en intermuda. De los 155 individuos restantes, 49 (31.6%) presentaban quistes visibles de *C. solearis* y 106 (68.4%) no los presentaban. No hubo diferencias significativas en el índice de refracción de la hemolinfa (IRH) entre langostas con quistes de tremátodos y langostas sin quistes de tremátodos (prueba de rangos de Wilcoxon,  $W = 3874.5$ ,  $p = 0.9613$ ) (Figura 2).

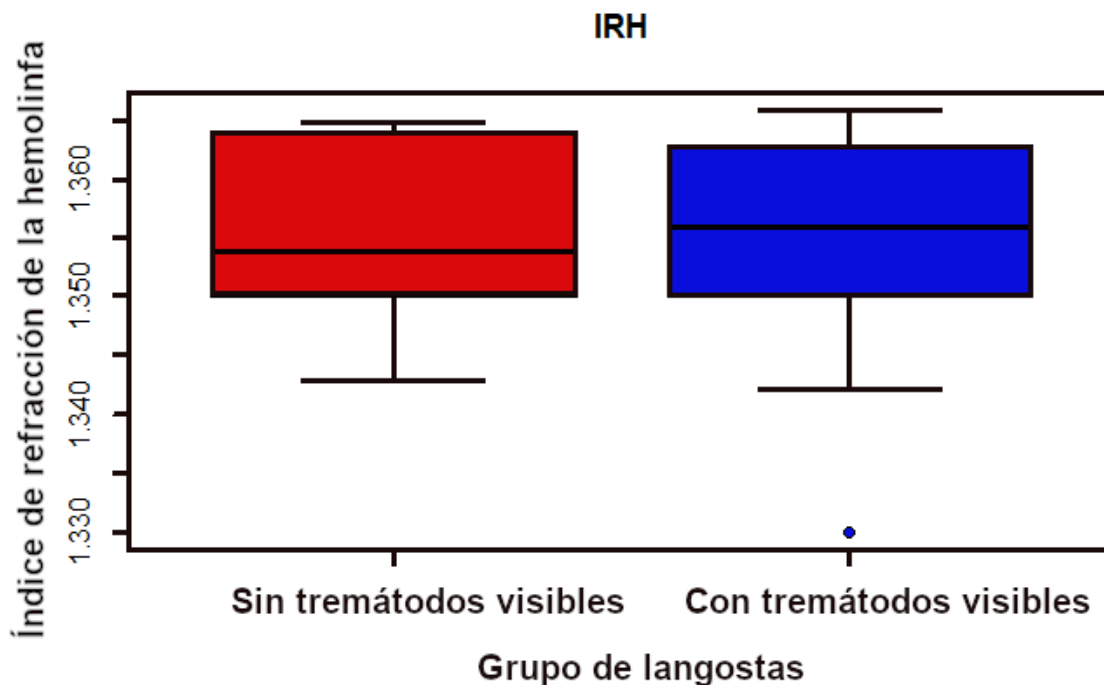


Figura 2 Gráfico de caja y bigote representando el índice de refracción de la hemolinfa de las langostas sin tremátodos visibles y con tremátodos visibles durante los muestreos. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo valores extremos. Los círculos son valores extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior.



## Efectos de *C. solearis* en la comunicación química entre langostas

En el tratamiento SS, el 63% (intervalo de confianza del 95%: 42.2–80.6%) de las langostas focales sanas mostraron atracción al estímulo sano. Este resultado no difirió significativamente del azar ( $p = 0.2478$ ). En el tratamiento SP, el 47.4% (IC95%: 24.2–71.1%) de los focales parasitados mostró atracción al estímulo sano, lo cual no difirió del azar ( $p = 1$ ). En el tratamiento PS, el 50% (IC95%: 31.88–68.11%) de los focales sanos mostraron atracción al estímulo parasitado por *C. solearis*, resultado que tampoco difirió del azar ( $p = 1$ ), mientras que en el tratamiento PP el 60.6% (IC95%: 42.13–77.09%) de los individuos parasitados mostró atracción por otros coespecíficos parasitados por *C. solearis*. Una vez más, este resultado no difirió del azar ( $p = 0.2962$ ) (Tabla 1, figura 3). El resultado de la tabla de contingencia mostró que no hubo diferencias significativas entre los cuatro tratamientos ( $\chi^2 = 1.8552$ , g.l. = 3,  $p = 0.6029$ ).

Tabla 1: Atracciones y evitaciones de langostas en laberintos en Y. Resultados de los cuatro tratamientos del experimento de laberintos en Y: SS (langosta estímulo sana, langosta focal sana), SP (langosta estímulo sana, langosta focal parasitada), PS (langosta estímulo parasitada, langosta focal sana) y PP (langosta estímulo parasitada, langosta focal parasitada).  $\hat{p}$ : Proporción de langostas focales que eligieron el refugio que emanaba las señales químicas de la langosta estímulo.

Tratamiento	N	Atracciones	Evitaciones	$\hat{p}$	IC 95%	$p$
SS	27	17	10	0.63	0.42 - 0.80	0.25
SP	19	9	10	0.47	0.24 - 0.71	1
PS	32	16	16	0.50	0.31 - 0.68	1
PP	33	20	13	0.61	0.42 - 0.77	0.3

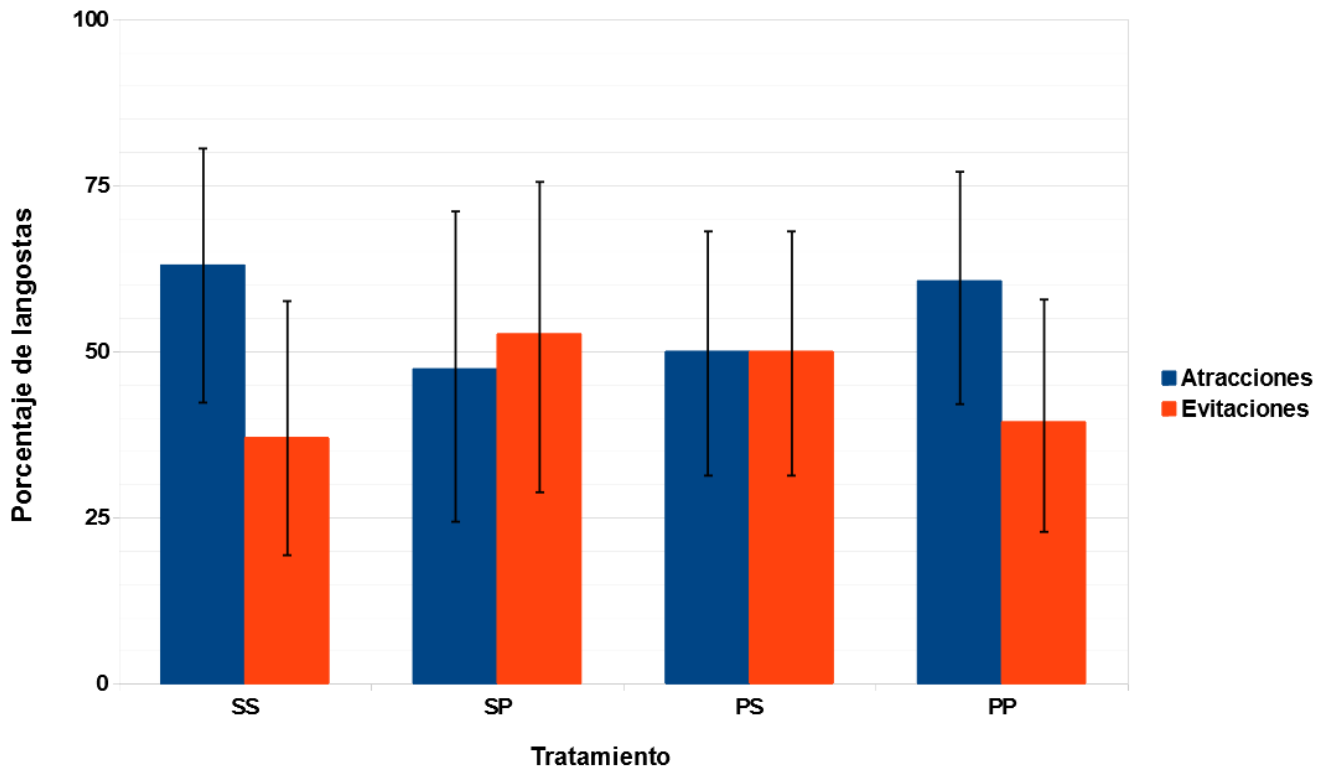


Figura 3: Resultados de los experimentos de los laberintos en Y para los tratamientos focal sano-estímulo sano (SS, N = 27), focal parasitado-estímulo sano (SP, N = 19), focal sano-estímulo parasitado (PS, N = 32) y focal parasitado-estímulo parasitado (PP, N = 33). En azul se muestra el porcentaje de langostas que eligió el refugio con agua proveniente de un coespecífico (atracción) mientras que en rojo se muestra el porcentaje de langostas que eligió el refugio control (evitación). Las barras de error representan los intervalos de confianza.

### Respuesta de escape

Durante los experimentos de respuesta de escape se midieron siete distintos componentes del escape (natación retrógrada) (Tabla 2). No se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de langostas en la distancia recorrida ( $H = 1.6063$ ,  $p = 0.658$ ), tiempo de reacción ( $H = 5.4714$ ,  $p = 0.1404$ ), duración del nado ( $H = 1.0479$ ,  $p = 0.7897$ ), ni velocidad promedio ( $H = 2.6122$ ,  $p = 0.4554$ ). En cambio, sí se encontraron diferencias significativas en la aceleración ( $H = 12.348$ ,  $p = 0.0062$ , figura 4), la fuerza ( $H = 12.197$ ,  $p = 0.0062$ ) y el trabajo ( $H = 16.111$ ,  $p = 0.0062$ ) realizado. Debido a que tanto la fuerza como el trabajo derivan de la aceleración, estos variaron en el mismo sentido que la aceleración. En todos los casos, la diferencia significativa se encontró entre el grupo no

infectado y los otros tres grupos (con infección leve, moderada y alta), los cuales no difirieron significativamente entre ellos y mostraron valores significativamente menores que el grupo de langostas no infectadas.

Tabla 2: Componentes de la natación retrógrada según los niveles de infección. *Distancia recorrida durante un evento de escape (en m), tiempo que tardó un individuo para iniciar la respuesta de escape (en s), duración del evento de natación (hasta que el individuo tocó el suelo, en s), velocidad de natación (en m/s), aceleración (en m/s<sup>2</sup>), fuerza ejercida (en N) y trabajo realizado (en J). Los datos mostrados son las medianas [IC 95%] de cada uno de los grupos de langostas: sin infección (0 quistes, N = 21), ligeramente infectados (0 a 10 quistes, N = 19), con infección moderada (11 a 30 quistes, N = 21) y con infección alta (31 quistes o más, N = 19).*

	Sin infección	Infección ligera	Infección moderada	Infección Alta	H	p
Distancia recorrida (m)	1.40 [0.65, 1.84]	1.0 [0.67, 1.77]	1.25 [0.55, 2.15]	1.5 [0.82, 3.32]	1.60	0.658
Tiempo de reacción (s)	0.79 [0.55, 1.27]	0.7 [0.5, 0.83]	0.55 [0.39, 0.76]	0.75 [0.53, 0.94]	5.47	0.1404
Duración del nado (s)	1.45 [0.91, 2.97]	1.37 [1.0, 2.52]	2.12 [1.28, 2.53]	2.19 [1.09, 3.65]	1.04	0.7897
Velocidad (m/s)	0.85 [0.61, 1.01]	0.72 [0.54, 0.86]	0.68 [0.61, 0.84]	0.83 [0.66, 0.99]	2.61	0.4554
Aceleración (m/s <sup>2</sup> )	1.15 [0.46, 2.02]	0.45 [0.26, 0.77]	0.29 [0.20, 0.72]	0.4 [0.19, 0.68]	12.3	0.0062
Fuerza (N)	0.70 [0.26, 1.56]	0.33 [0.18, 0.45]	0.21 [0.14, 0.40]	0.27 [0.11, 0.45]	12.19	0.0067
Trabajo (J)	0.79 [0.35, 1.04]	0.33 [0.21, 0.53]	0.32 [0.23, 0.53]	0.45 [0.25, 0.55]	16.11	0.001

## Aceleración

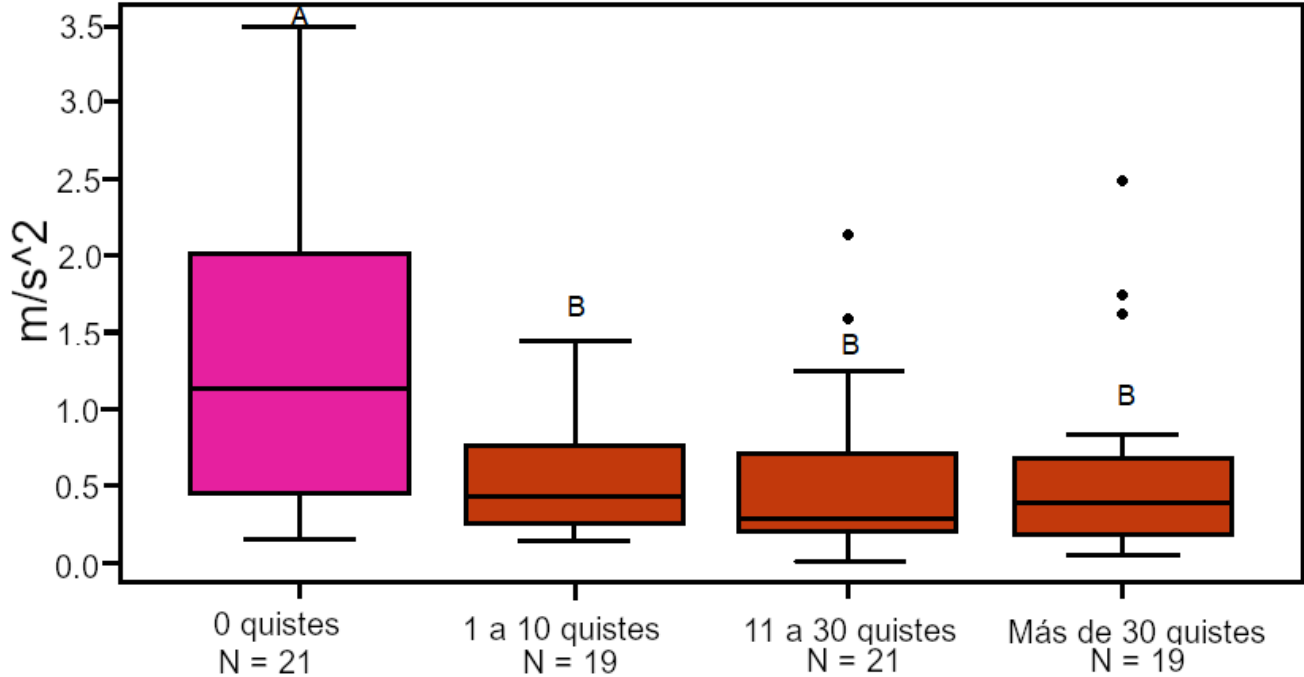


Figura 4: Gráfico de caja y bigote representando la aceleración de las langostas calculada durante un evento de escape separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo valores extremos. Los círculos son valores extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican a los grupos similares entre ellos.

## Tasa de crecimiento

No se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento entre los grupos de langostas previamente establecidos ( $H = 3.3752$ ,  $p = 0.3373$ ) (figura 5).

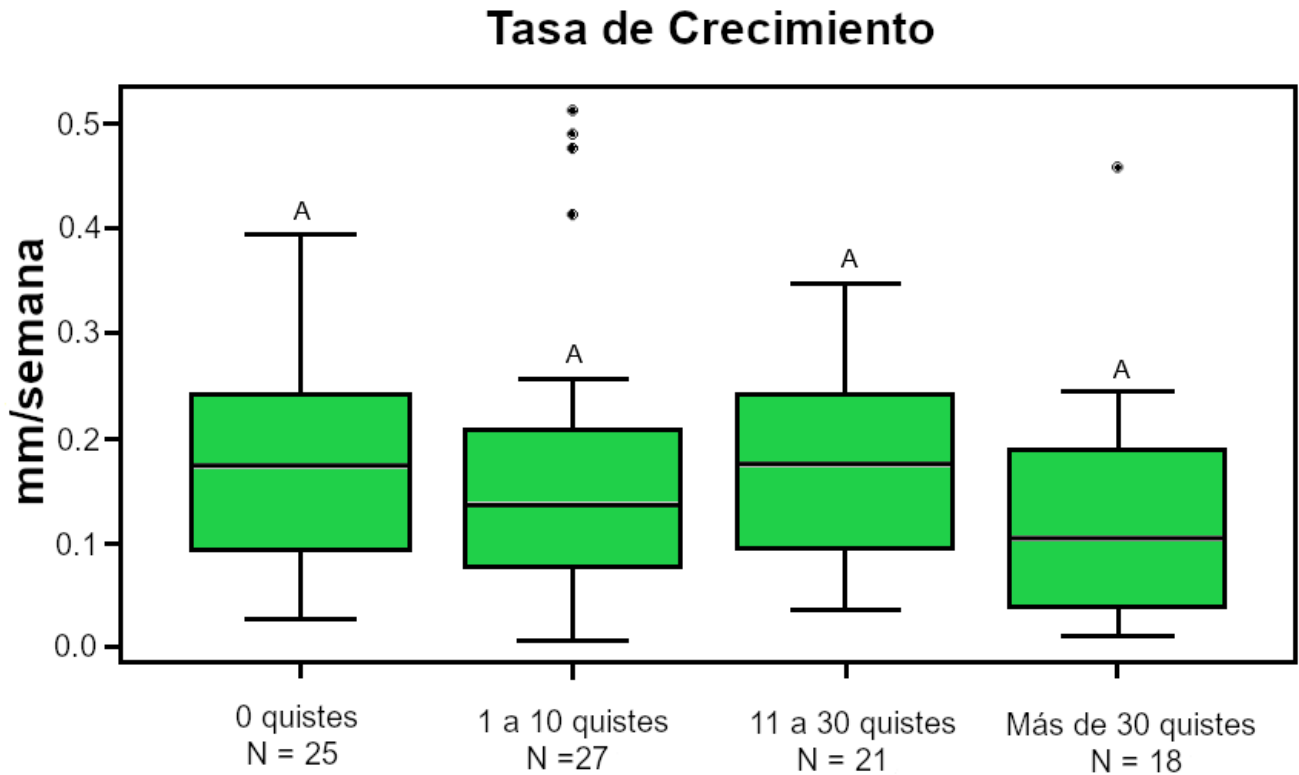


Figura 5: Gráfico de caja y bigote representando la tasa de crecimiento de *P. argus* en cautiverio separados en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. Las letras marcan a las poblaciones similares entre ellas. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican a los grupos similares entre ellos.

## Concentración de neuromoduladores

No se encontró una diferencia significativa en las concentraciones de dopamina en plasma entre los grupos de langostas (N = 68, H = 4.5653,  $p = 0.2065$ , figura 6); sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de serotonina en el plasma entre grupos de langostas (N = 84, H = 27.653,  $p < 0.0001$ , figura 7). Una prueba de comparaciones múltiples *post hoc* reveló que las langostas mediana y altamente infectadas por *C. solearis* poseen concentraciones de serotonina en el plasma significativamente más altas que las langostas no infectadas y las ligeramente infectadas.

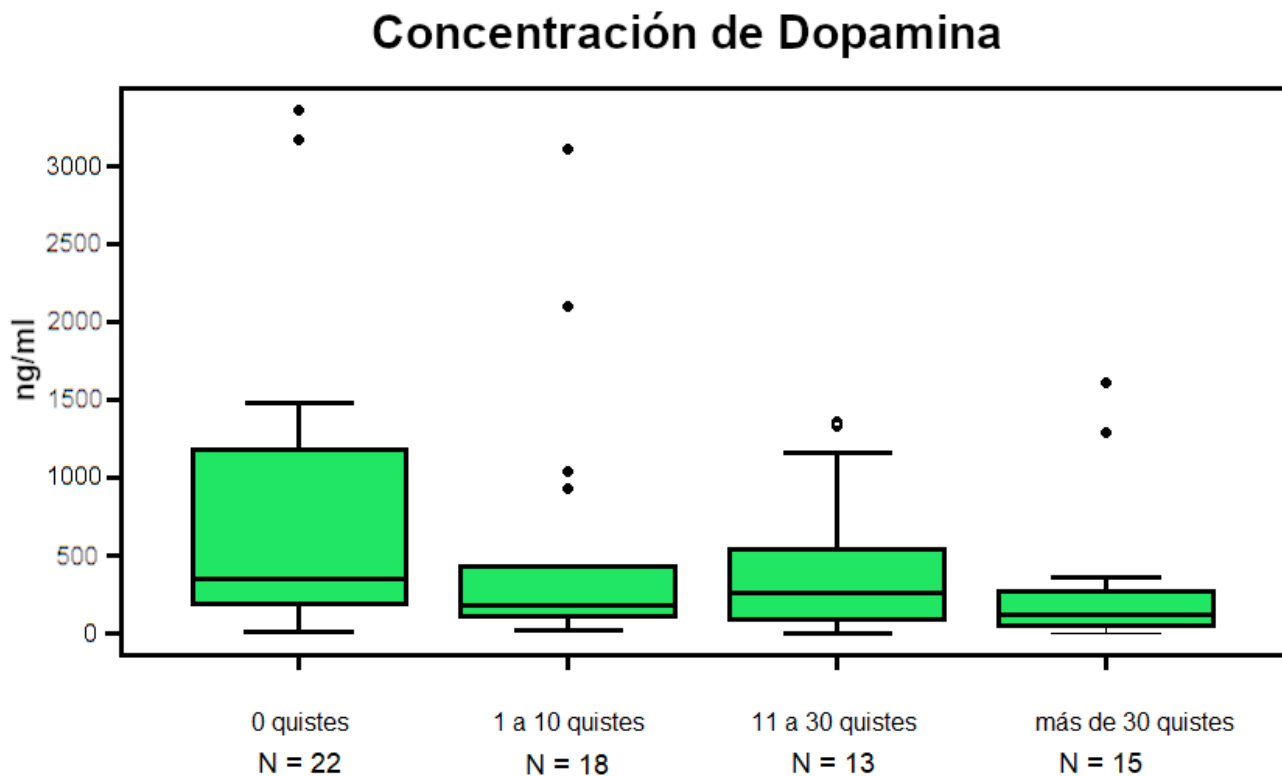


Figura 6: Gráfico de caja y bigote representando las concentraciones de dopamina en el plasma de langostas separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior.

## Concentración de Serotonina

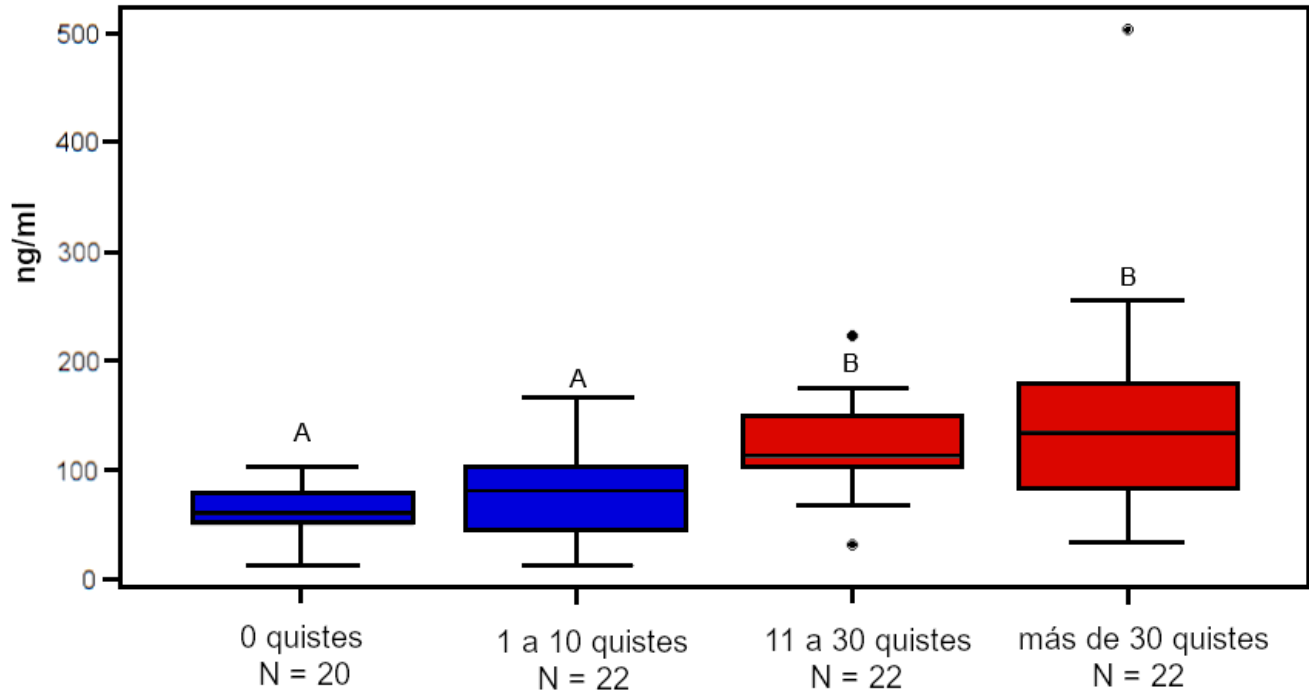


Figura 7: Gráfico de caja y bigote representando las concentraciones de serotonina en el plasma de langostas separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican grupos similares.

## **Estado nutricional**

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de albúmina ( $H = 1.6473$ ,  $p = 0.6487$ , figura 8), colesterol ( $H = 2.8152$ ,  $p = 0.421$ , figura 9) y proteína total en hemolinfa ( $H = 3.2978$ ,  $p = 0.348$ , figura 10), ni en el índice hepatosomático ( $H = 2.4831$ ,  $p = 0.4784$ , figura 11) entre los cuatro grupos de langostas (Tabla 3). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de glucosa entre los diferentes grupos ( $H = 9.4533$ ,  $p = 0.0238$ , tabla 3, figura 12). Una prueba de comparaciones múltiples indicó que la concentración de glucosa en el plasma de las langostas con infección alta (>30 quistes) fue significativamente menor que en los otros tres grupos ( $p = 0.0314$ ).

Tabla 3: Pruebas de Kruskal-Wallis para los indicadores del estado nutricional. *Resultados de las pruebas de Kruskal-Wallis para diferentes indicadores del estado nutricional. En el caso de la albúmina, colesterol, proteína total y glucosa se utilizaron solamente individuos en intermuda o premuda temprana (estadios C o D<sub>0</sub> en la escala de Drach).*

	N	H	p
Albúmina	70	1.65	0.65
Colesterol	70	2.82	0.42
Proteína Total	70	3.3	0.35
Glucosa	70	9.45	0.02
IH	122	2.48	0.48



## Concentración de Albúmina

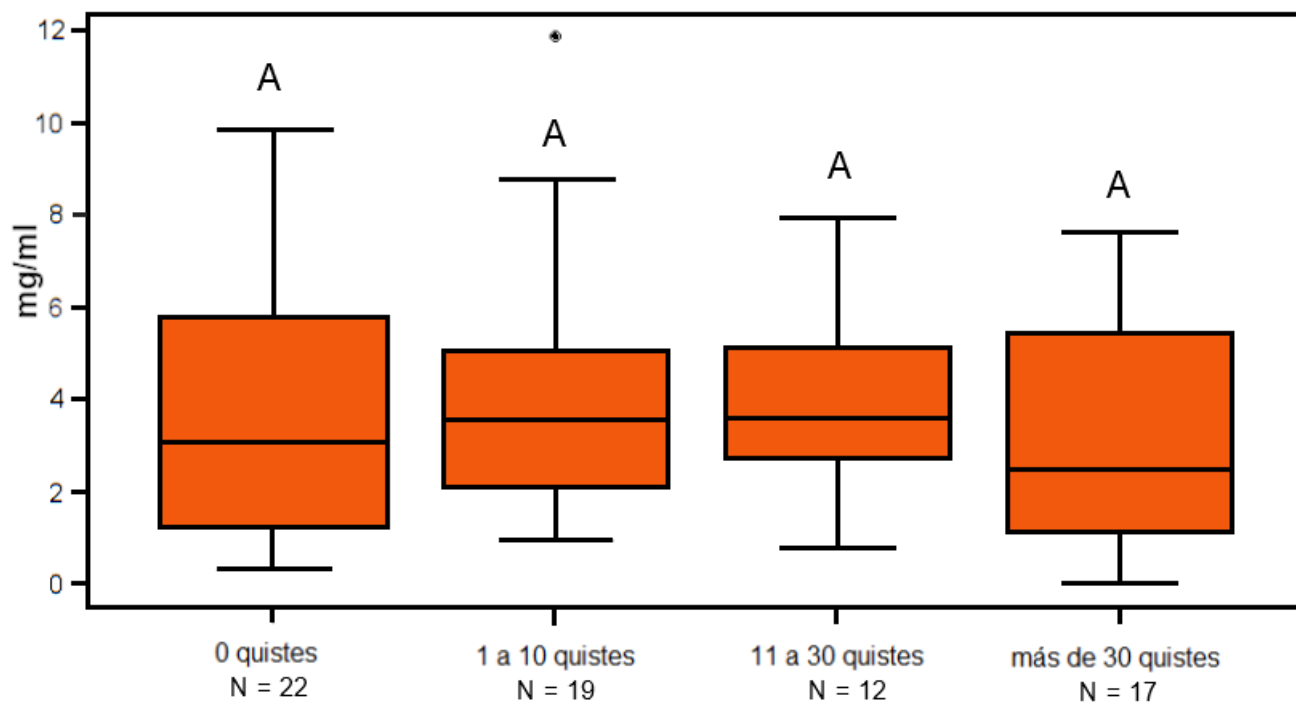


Figura 8: Gráfico de caja y bigote representando las concentraciones obtenidas de albúmina en el plasma de langostas separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican grupos similares.

## Concentración de Colesterol

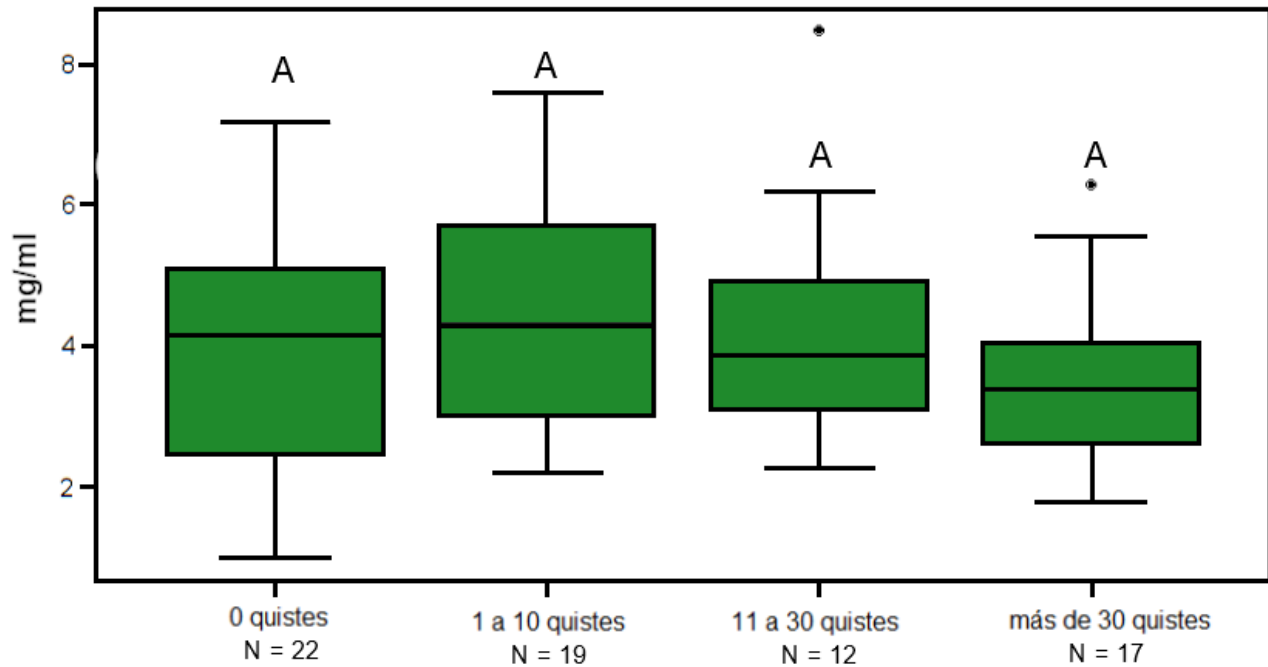


Figura 9: Gráfico de caja y bigote representando las concentraciones obtenidas de colesterol en el plasma de langostas separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican grupos similares.

## Concentración de Proteína Total

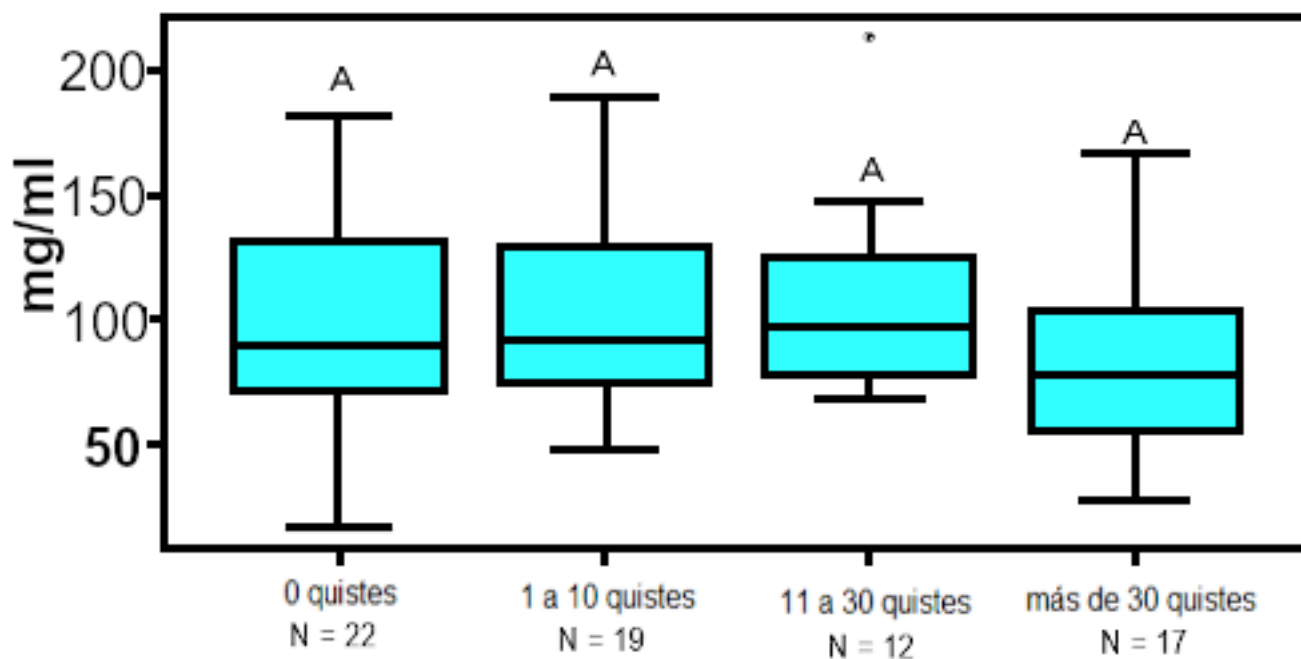


Figura 10: Gráfico de caja y bigote representando las concentraciones obtenidas de proteína total en el plasma de langostas separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican grupos similares.

## Índice Hepatosomático

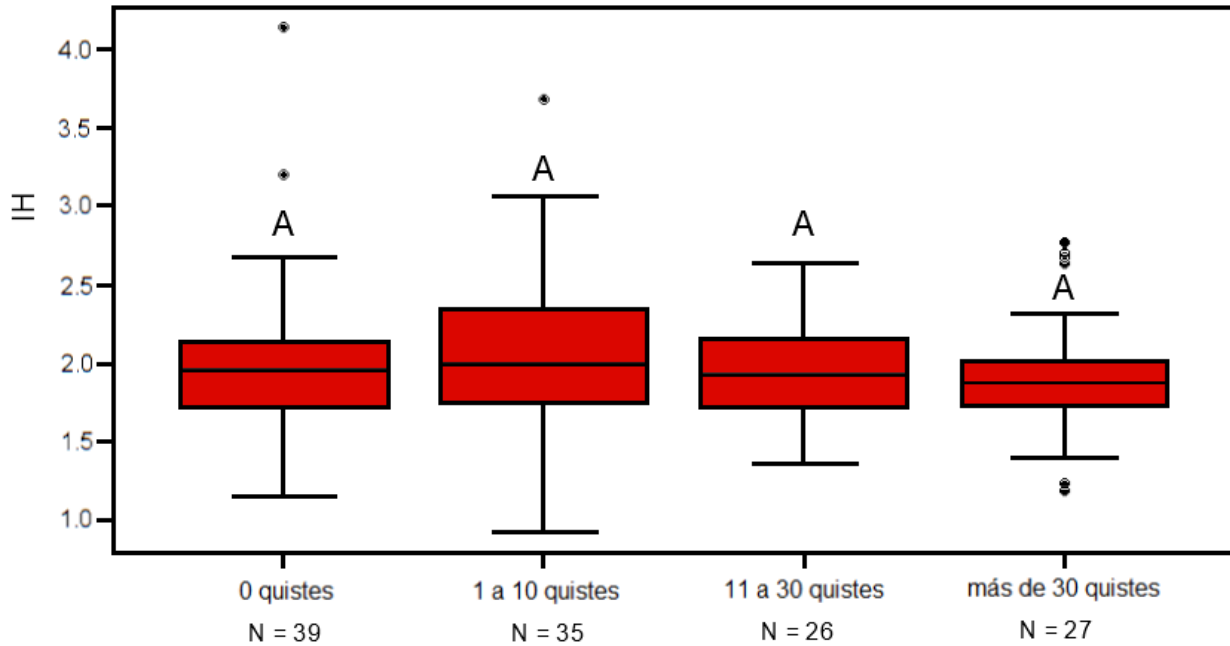


Figura 11: Gráfico de caja y bigote representando el índice del hepatopáncreas húmedo separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican grupos similares.

## Concentración de Glucosa

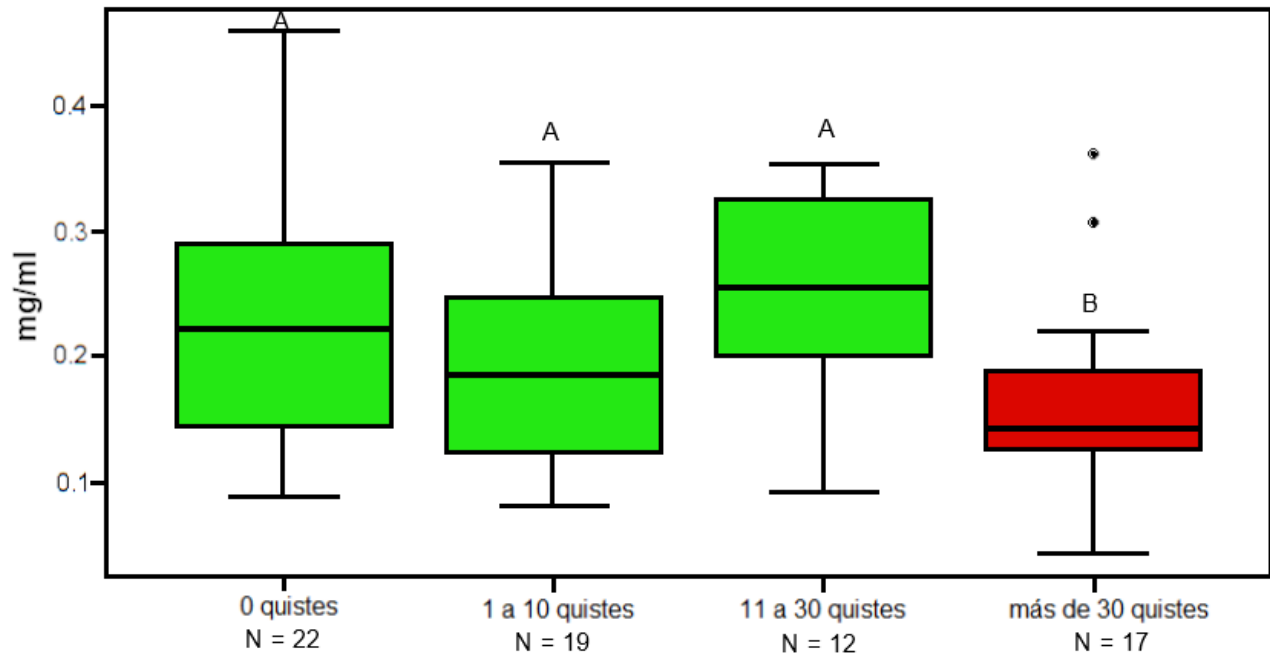


Figura 12: Gráfico de caja y bigote representando las concentraciones obtenidas de glucosa en el plasma de langostas separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican grupos similares.

## Conteo de hemocitos

No se encontraron diferencias significativas en la densidad de hemocitos entre los cuatro grupos de langostas ( $H = 2.2105$ ,  $p = 0.5299$ ) (figura 13).

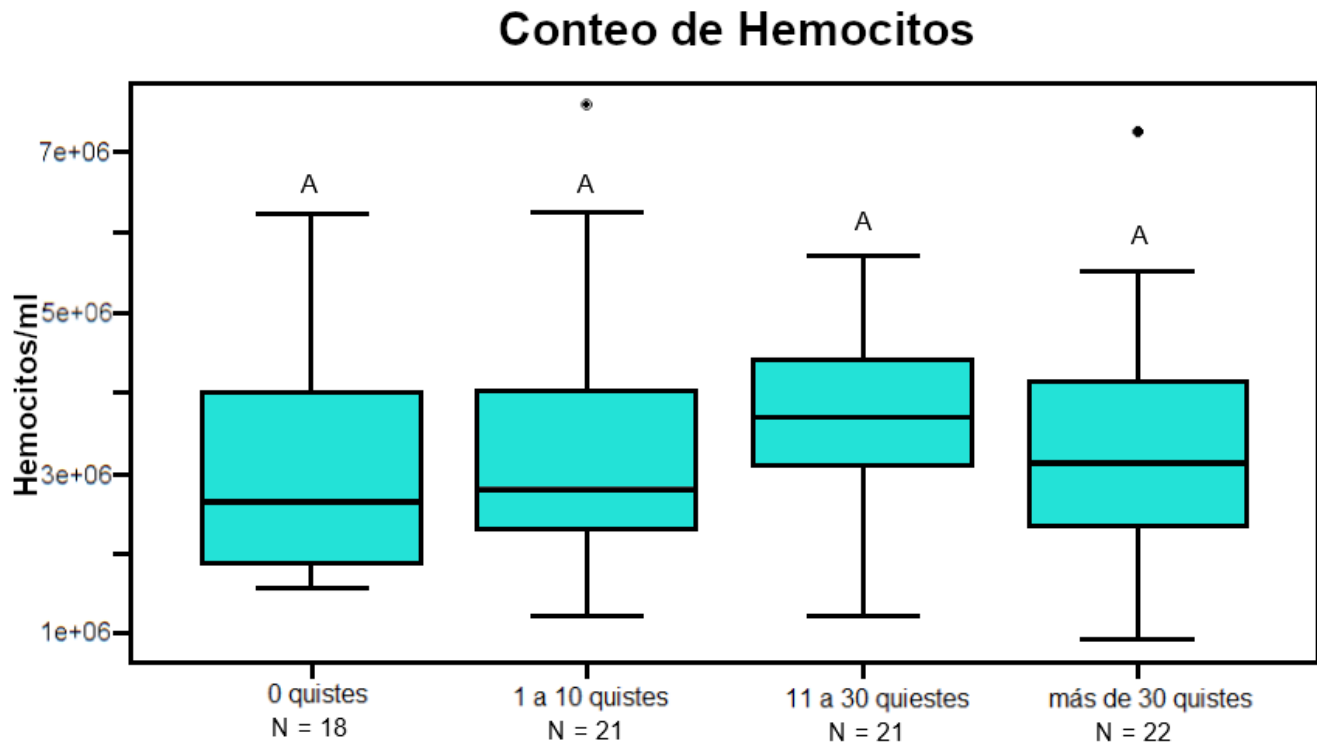


Figura 13: Gráfico de caja y bigote representando la concentración de hemocitos en la hemolinfa de las langostas separadas en cuatro grupos con base en la intensidad de la infección: sin quistes (0), de 1 a 10 quistes, de 11 a 30 quistes y más de 30 quistes. La caja representa el primer y tercer cuartil (25% y 75% de los datos), la línea horizontal gruesa representa la mediana, y los bigotes representan los máximos o mínimos valores excluyendo aislados extremos. Los círculos son aislados extremos que sobrepasan el valor máximo o mínimo de su respectivo bigote por más de 1.5 veces el intercuartil superior. Las letras iguales indican grupos similares.

## ***Determinación de presencia de PaV1***

Ninguna de las langostas utilizadas en este estudio presentó signos clínicos de la infección por PaV1. Se realizaron pruebas de PCR a un total de 170 muestras de hemolinfa obtenidas de las langostas en cautiverio, de las cuales 108 fueron de langostas utilizadas en los experimentos de comunicación química y las otras 62 fueron de langostas utilizadas en el análisis bioquímico y experimentos de capacidad natatoria. De estas muestras 3 (2.7%) y 2 (3.2%) dieron positivas respectivamente sólo por PCR, con un total de 5 (2.9%) muestras positivas a PaV1.

## ***Sensibilidad y especificidad de la prueba visual***

Se mantuvieron 212 langostas en cautiverio con un intervalo de talla de 72.8 a 142.5 mm LC, de las cuales 28 (13.2%) tuvieron al menos un quiste de *C. solearis* visible. Sin embargo, una vez hecha la disección total, se encontraron quistes en 114 langostas (53.8%). Las langostas infectadas tenían en promedio  $4.6 \pm 0.6$  quistes de *C. solearis* en los músculos abdominales (de 0 a 27) mientras que en la base de las coxas de los pereiópodos se encontraron en promedio  $27 \pm 3.2$  quistes por langostas (de 0 a 199). El 14.7% de todos los quistes se encontraron en la musculatura abdominal y el 85.3% en las coxas, no todos los individuos infectados poseían quistes en el abdomen, pero casi todos (con la excepción de uno) tuvieron quistes en las coxas. Uno de los individuos anteriormente identificado como infectado no mostró quistes tras su disección y se le consideró como falso positivo (tenía una mancha en la musculatura que fue confundida con un quiste). La sensibilidad calculada fue de 24.6% (28 identificadas visualmente, 114 identificados por disección) (IC95%: 17.6–33.2%), mientras que la especificidad encontrada fue de 99.1% (98 sin quistes, 1 falso positivo) (IC95%: 94.5–99.9%).

### Relación entre talla e intensidad de la infección

No hubo una correlación significativa entre la talla de las langostas y la intensidad de la infección con *C. solearis* ( $r = 0.045$ ,  $p = 0.6105$ ) (figura 14).

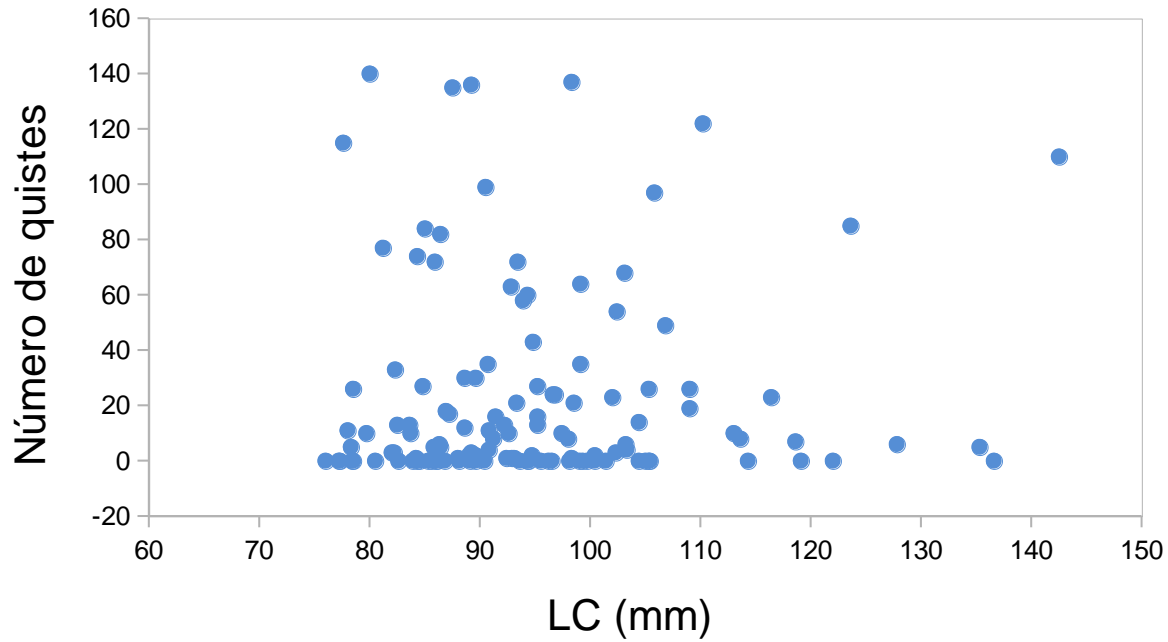


Figura 14: Relación entre el número de quistes de *C. solearis* encontrados en cada individuo disectado y el tamaño del individuo (longitud cefalotoracia, LC, en mm). No se encontró una correlación significativa entre la talla de las langostas y la intensidad de la infección por *C. solearis* ( $r = 0.045$ ,  $p = 0.6105$ ;  $N = 135$ ).



## **Discusión**

En el presente estudio se compararon diversas variables fisiológicas y conductuales entre langostas *P. argus* no infectadas e infectadas con *C. solearis*.

En los crustáceos, como se mencionó antes, el IRH brinda una apreciación rápida del estado nutricional de un organismo, ya que está correlacionado con la cantidad de proteína en la hemolinfa (Lorenzon et al., 2011). Algunas infecciones parasitarias disminuyen el IRH de un hospedero de manera significativa a comparación de los individuos no infectados, reflejando un costo fisiológico de estas infecciones (Behringer et al., 2007). Debido a que se trata de un método poco invasivo, en un principio se estimó el IRH de las langostas en los muestreos de campo que se hicieron en Bahía de la Ascensión.

No se encontraron diferencias significativas entre el IRH de langostas visiblemente infectadas y visiblemente no infectadas. Sin embargo, una vez disectados los individuos utilizados en el laboratorio, se estableció que la determinación visual de la infección tuvo una sensibilidad de 24.6% y una especificidad del 99.1%. Esto sugiere que por cada langosta visiblemente infectada por *C. solearis* hay otras tres más que también están infectadas, pero no de manera visible, y que existe una probabilidad de 1% de confundir marcas (tales como cicatrices) en el músculo con quistes de *C. solearis* (Altman y Bland, 1994). Así, la sola determinación visual resulta insuficiente para determinar si una langosta está o no infectada con *C. solearis*. y por lo tanto no es válido comparar el IRH de langostas visiblemente infectadas con las visiblemente no infectadas para determinar si la infección afecta la condición nutricional o no. Futuros estudios deberán tomar esto en cuenta, de ser posible disectando a los individuos utilizados para determinar la intensidad de la infección, aunque esto anularía la ventaja que tiene el índice de refracción de la hemolinfa como una forma poco invasiva de determinar el estado nutricional de los animales de manera rápida.

En los experimentos realizados para analizar posibles efectos de *C. solearis* en la comunicación química de *P. argus*, no se encontró ningún efecto en la elección de refugio por parte de las langostas en ninguno de los tratamientos seleccionados. De los cuatro tratamientos, ninguno de ellos difirió del azar, lo que significa que la infección por *C. solearis*

no afecta las señales químicas de *P. argus* como lo hace, por ejemplo, el virus PaV1 en la misma especie (Candia-Zulbarán et al., 2015). Las metacercarias de este tremátodo se localizan en el tejido muscular de su hospedero, a diferencia del virus que se replica en las células hemáticas y puede tener consecuencias fatales. En otros trematodos parásitos, las metacercarias invaden otros órganos o incluso el sistema nervioso central (Helluy y Thomas, 2010, Montes et al., 2020), provocando síndromes de infección complejos capaces de modificar ciertos comportamientos del hospedero, pero este no parece ser el caso para *C. solearis*.

La condición nutricional general de las langostas no se vio afectada por la presencia de quistes de *C. solearis* en su musculatura, con la excepción de la concentración de glucosa. Las langostas altamente infectadas (con más de 30 quistes) mostraron tener una concentración significativamente menor de glucosa en su plasma que aquellas con menos quistes o sin quistes. La glucosa es una de las moléculas más importantes en el catabolismo y un paso importante para la obtención de energía a nivel celular (Krebs y Johnson, 1937; Fothergill-Gilmore y Michelis, 1993) y algunas infecciones parasitarias pueden bajar su concentración. Esta disminución en la concentración de glucosa podría ser indicativa del costo metabólico que tiene una infección sobre su hospedero (Holmes y Zohar, 1990; Mayack y Naug, 2010; Thomas et al., 2010).

Un quiste es una estructura de resistencia en la cual un organismo puede permanecer un largo tiempo de manera latente. Aunque los quistes forman una barrera física entre el organismo enquistado y el medio, los quistes no son estructuras completamente aisladas y sus paredes son permeables a ciertas sustancias. Por ejemplo, en el caso del digéneo *Clinostomum marginatum*, la pared de su quiste permite el libre paso de glucosa (Larson et al., 1988). Aunque se conoce poco sobre el metabolismo de las metacercarias (Cheng, 1986), existe la posibilidad de que las metacercarias de *C. solearis* utilicen la glucosa de la hemolinfa de la langosta como alimento durante el tiempo que se encuentran infectando a *P. argus*, resultando en una concentración más baja de la glucosa en la hemolinfa de las langostas que solo se alcanza a observar en las langostas altamente infectadas.

De los siete componentes de la respuesta de escape que se midieron en el laboratorio, solo se observaron diferencias en la aceleración, fuerza y trabajo entre langostas infectadas (independientemente de la intensidad) y sin infectar. Los tres grupos de langostas infectadas por *C. solearis* mostraron una aceleración menor que las langostas libres del tremátodo. Este resultado sugiere que las langostas infectadas tardarían más tiempo en alcanzar su velocidad máxima de escape que las langostas sin tremátodos. Una aceleración más lenta podría favorecer que las langostas infectadas fueran alcanzadas más fácilmente por un depredador como una tortuga. En total, el 14.7% de los quistes (con una media de  $4.9 \pm 0.7$  quistes por langosta) de *C. solearis* se encontró en los músculos abdominales mientras que el 85.3% ( $28.4 \pm 3.5$  quistes por langosta) restante se encontró en las coxas de los pereiópodos. No todos los individuos infectados contenían quistes en los músculos abdominales, pero casi todos los infectados (con excepción de uno) tenían quistes en las coxas de los pereiópodos. La mayor carga de quistes en las coxas que en el abdomen sugiere que la menor aceleración de las langostas infectadas no se debe a que los quistes interfieran físicamente con la contracción del abdomen para llevar a cabo la natación retrógrada, como ocurre con langostas *Nephrops norvegicus* infectadas con el dinoflagelado parásito *Hematodinium* sp. (Stentiford et al. 2015). Sin embargo, esto no significa que los quistes de *C. solearis* no puedan afectar físicamente a la langosta. También existe la posibilidad de que la alta presencia de quistes en las coxas interfiera con el posicionamiento de los pereiópodos durante el nado, de tal forma que la resistencia hidrodinámica del individuo sea mayor y así disminuya la aceleración.

Un efecto semejante fue observado en el camarón de pastizales marinos *Palaemonetes pugio*, el cual es hospedero intermediario del digéneo *Microphallus turgidus*, cuyas metacercarias se enquistan mayoritariamente en los músculos abdominales de esa especie. Kunz y Pung (2004) encontraron que la natación de este camarón se ve severamente afectada en los individuos infectados en comparación con los no infectados, independientemente de la intensidad de la infección. Los autores consideraron la posibilidad de que al estar las metacercarias de *M. turgidus* enquistadas en el abdomen del camarón, estas afecten su natación interfiriendo con la retracción del abdomen. De manera similar, Rebolledo y colaboradores (2014) observaron también que la interferencia en la natación del

pez *Girella laevis* provocada por el tremátodo bucefálico *Proserhynchoides* sp. no era proporcional a la intensidad de la infección, sugiriendo que las metacercarias, enquistadas mayoritariamente en la base de la aleta caudal y no en la musculatura, provocan algún tipo de inflamación, hemorragia localizada y/o destrucción celular, efectos que son metabólicamente exigentes.

En un estudio más reciente sobre *P. pugio* se observó que los patrones de evitación de depredadores también se encuentran alterados en camarones infectados. Los camarones infectados pasaban menos tiempo quietos y su retraso al primer movimiento era menor que los no infectados (se mantenían menos tiempos quietos antes de moverse en presencia de un depredador), además de que pasaban menos tiempo escondidos en refugios y por lo tanto eran más fácilmente identificables por depredadores visuales (González, 2016). La forma en la cual *M. turgidus* interfiere con el comportamiento de *P. pugio* sigue sin conocerse, pero la hipótesis más aceptada es que sea por un efecto neurológico, fisiológico o una mezcla de ambos.

Muchas respuestas conductuales en invertebrados están reguladas por ciertos neuromoduladores. Por ejemplo, la epinefrina juega un papel importante en las respuestas de “pelea o huida” y la octopamina, un análogo de la noradrenalina en mamíferos, induce la contracción de los músculos abdominales en langostas *Homarus americanus* y cangrejos de río *Astacus astacus* (Kravitz, 1988). Otros neuromoduladores importantes son la dopamina, la cual muchas veces modula patrones de comportamiento y el aprendizaje (Scheider et al., 2006; Raza y Su, 2019) y la serotonina, que entre otras cosas modula algunas respuestas agonísticas intraespecíficas, así como del comportamiento de escape (Huber et al., 1997; Edwards y Kravitz, 1997).

Estos patrones de comportamiento se encuentran asociados a la concentración de los neuromoduladores tanto en el sistema nervioso central como fuera de él, y a la cantidad y calidad de los distintos receptores que existen en los tejidos. La influencia que pueden tener diferentes tipos de parásitos en las concentraciones de los diferentes neuromoduladores en sus respectivos hospederos está bien documentada (Scheider et al., 2006; Thomas et al.,

2010; Libersat et al., 2009, 2018; Raza y Su, 2019) y por lo tanto es importante analizar sus concentraciones durante una infección.

La concentración de dopamina obtenida en el plasma de las langostas presentó una variabilidad muy alta, desde cantidades menores a 1 ng/ml hasta cantidades superiores a 3000 ng/ml en los casos más extremos, a pesar de lo cual no se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los cuatro grupos de langostas. En cambio, sí se observaron claras diferencias en las concentraciones de serotonina en el plasma dependiendo de la intensidad de la infección. Las langostas mediana y altamente infectadas con el tremátodo mostraron niveles más altos de serotonina a comparación de las langostas sin tremátodos o con una baja infección, lo que sugiere que *C. solearis* podría tener algún tipo de influencia en la concentración de este neuromodulador. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual el tremátodo pudiera influir en la concentración de serotonina, en otras infecciones parasitarias se ha demostrado que existe una base genética para la modificación del comportamiento fenotípico, o al menos sobre el sistema nervioso, del hospedero, como es en el caso de algunos insectos himenópteros y lepidópteros (Hoover et al., 2001; Libersat et al., 2009; Bekker et al., 2015).

La serotonina es un neuroregulador que juega un papel importante en el comportamiento de los decápodos. Los experimentos de Edwards y Kravitz (1997) mostraron que al inyectar una solución alta en serotonina directamente a la hemolinfa a individuos subordinados de *A. astacus* y de *H. americanus*, se “renovaba su voluntad” para luchar contra un individuo dominante contra el que previamente habían perdido un enfrentamiento. En el caso de *P. argus*, si un aumento en la concentración de serotonina en la hemolinfa indujera un comportamiento similar en una langosta subordinada, esto podría causar que dicha langosta fuera expulsada de un refugio comunal, lo que podría aumentar su riesgo de depredación. Si se toma en consideración que estas langostas infectadas tienen además una respuesta de escape alterada, entonces el riesgo de depredación sería todavía más alto para una langosta infectada por *C. solearis* que para una langosta no infectada.

Aunque la serotonina también tiene efectos en el comportamiento de escape, no se encontraron diferencias en el tiempo de reacción ante un estímulo de depredación entre langostas infectadas y no infectadas. Los mecanismos de defensa y antidepredador de estas langostas han sido extensivamente estudiados (Herrnkind et al., 2001; Briones-Fourzán et al., 2006). Las langostas *P. argus* se alimentan en lugares abiertos y aunque suelen tener hábitos nocturnos también se les puede encontrar caminado durante el día, cuando las probabilidades de encontrarse a un depredador son mayores. Esta especie presenta comportamientos defensivos más arriesgados que otra especie del mismo género con la cual comparte territorio (*Panulirus guttatus*). Por ejemplo, al encontrarse con un depredador en áreas abiertas, las langostas *P. argus* retrasan su primer movimiento, evitando así ser detectadas por depredadores visuales. Si esto falla, entonces utilizan sus antenas cubiertas de espinas para defenderse de ataques y a veces incluso llegan a enfrentar a sus atacantes. Como última defensa, escapan utilizando la natación retrógrada. El comportamiento de escape alterado que se encontró en el presente trabajo sugiere que *C. solearis* provoca algún tipo de interferencia cuyo origen se desconoce. La disminución en la aceleración podría ser un efecto físico de los quistes hiriendo el tejido o afectando de alguna forma la resistencia hidrodinámica del animal, o incluso podría ser efecto de la disminución en la cantidad de glucosa disponible en la hemolinfa. La alta concentración de serotonina también podría tener consecuencias sobre el comportamiento de las langostas al enfrentarse a un depredador; no solo como ya fue mencionado antes, sino que langostas más agresivas podrían pasar menos tiempo quietas antes de moverse o incluso enfrentarse al depredador sin tener el tamaño suficiente para sobrevivir un enfrentamiento y así resultar sometidas. En futuros experimentos sería conveniente comparar otros mecanismos de defensa y antidepredador entre langostas infectadas y no infectadas, tales como el retraso al primer movimiento, la fuerza de agarre al sustrato, y la autotomía de los pereiópodos (Briones-Fourzán et al., 2006), tomando en cuenta que la mayoría de los quistes de metacercarias se encontraron en las coxas.

Los resultados antes discutidos sugieren que de alguna forma la infección por *C. solearis* podría aumentar la probabilidad de depredación de langostas infectadas, sin embargo, no se encontró correlación alguna entre la talla de los individuos y la intensidad de

la infección. La mortalidad del hospedero inducida por el parásito en este tipo de gráfico se observa como una correlación linear negativa, mientras que una correlación linear positiva se observa cuando los hospederos van acumulando parásitos a lo largo de su ciclo de vida sin que este induzca mortalidad en ellos (Koehler y Poulin, 2010). También es posible observar una relación curvilínea (que ocurre cuando la intensidad de la infección aumenta con la talla, pero decrece después de cierto tamaño), como en el caso del cangrejo *Halicarcinus varius* el cual es infectado por el tremátodo *Microphallus novaezealandensis* (Koehler y Poulin, 2010), pero una correlación cuadrática tampoco fue significativa en el caso de *P. argus* y *C. solearis*. Este resultado dificulta establecer una relación directa entre la intensidad de infección por *C. solearis* y mortalidad de los individuos infectados, aunque esto no descarta la idea de que la infección pueda tener efecto sobre la tasa de depredación ya que como se observó en los resultados del experimento de respuesta de escape el síndrome de infección puede no depender de la intensidad de la infección, o los efectos de esta pueden ser sutiles (Marcogliese, 2004).

Un ejemplo de la sutileza del síndrome de infección por *C. solearis* se puede observar en el proceso de respuesta inmune innata de la langosta. Durante este proceso, los crustáceos encapsulan a los organismos invasores (Loker, 1994; Johansson et al., 2000; Lee y Söderhall, 2002; Bryan-Walker et al., 2007; Cerenius et al., 2010), por lo que se esperaba encontrar un aumento en la densidad de hemocitos en la hemolinfa de las langostas infectadas (Li et al., 2008). Sin embargo, dicha densidad no varió entre las langostas no infectadas y las langostas infectadas, independientemente de la intensidad de la infección. Si el parásito es capaz de atenuar o suprimir la respuesta inmune de la langosta o de alguna manera evadir por completo esta respuesta continúa sin ser determinado, pero para poder comenzar a poner a prueba esta hipótesis se podrían estudiar los niveles de las enzimas iniciadoras de esta cascada de señalización como lo es la fenoloxidasa.

Del total de 170 pruebas de PCR realizadas sólo cinco (2.9%) resultaron positivas a presencia del ADN de PaV1, pero ninguna langosta usada en este estudio presentó signos clínicos de la infección. La baja prevalencia se debe a que la probabilidad de la infección por PaV1 disminuye conforme aumenta el tamaño de las langostas (Behringer et al., 2011;

Davies et al., 2019) siendo los juveniles ( $\leq 50$  mm LC) los más susceptibles. En este estudio solo se utilizaron individuos adultos dentro de un rango de tallas de 72.8 a 142.5 mm de LC, fuera del rango de la población más susceptible. Debido a esto y a que no presentaron signos clínicos de la enfermedad, es probable que las cinco langostas positivas fueran solo portadoras y que no afectaran los resultados obtenidos.

De todas las características fisiológicas y conductuales de langostas *P. argus* analizadas en función de la infección con *C. solearis* en este estudio, solo se encontraron cambios significativos en tres: una menor aceleración (y por tanto en la fuerza y el trabajo realizado) durante el evento de escape en las langostas infectadas por *C. solearis*, independientemente de la intensidad de la infección; una concentración de glucosa significativamente menor en langostas altamente infectadas que en los otros tres grupos de langostas (medianamente infectadas, ligeramente infectadas y no infectadas), y una mayor concentración de serotonina en las langostas altamente y medianamente infectadas que en las langostas ligeramente infectadas y libres de infección. En conjunto, estas características alteradas sugieren que la infección con *C. solearis* podría alterar la conducta de las langostas haciéndolas más osadas, y su respuesta de escape haciéndola menos eficiente, lo que aumentaría la probabilidad de ser consumidas por el hospedero definitivo del tremátodo.



## **Conclusiones**

No se encontró un efecto significativo de la infección por *C. solearis* en la comunicación química entre langostas, en la concentración de proteína total, albúmina, colesterol y dopamina en la hemolinfa, así como en el índice hepatosomático y la densidad de hemocitos.

Las langostas *P. argus* infectadas por *C. solearis* mostraron una respuesta de escape disminuida independientemente de la intensidad de la infección, cuyos efectos y mecanismos de interferencia se desconocen, pero es posible que sea una interferencia mecánica, física o una mezcla de ambas.

No se encontró un efecto significativo por la infección de *C. solearis* en la tasa de crecimiento entre langostas infectadas y las no infectadas en cautiverio, independientemente de la intensidad de la infección.

Aunque la infección no tuvo un efecto significativo sobre la condición nutricional general de las langostas, las langostas altamente infectadas (con más de 30 quistes) tuvieron una concentración significativamente menor de glucosa en la hemolinfa que los otros tres grupos (0 quistes, 1 a 10 quistes y 11 a 30 quistes por individuo). Queda como incógnita si esta disminución se debe a que los parásitos utilizan la glucosa en la hemolinfa del hospedero para nutrirse, o si refleja la energía utilizada en combatir la infección. Sin embargo, es probable que una menor concentración de glucosa tenga un impacto negativo sobre la aptitud de las langostas.

La concentración de serotonina en la hemolinfa aumentó significativamente en langostas mediana y altamente infectadas (11 a 30 quistes y más de 30 quistes respectivamente). Es probable que la mayor concentración de serotonina en las langostas infectadas afecte su comportamiento, volviéndolas más osadas. Las implicaciones de estos niveles más altos de serotonina podrían investigarse de manera experimental.

La sensibilidad de la identificación visual de la infección determinada en este trabajo fue de 24.6% (IC95%: 17.6–33.2%), mientras que la especificidad encontrada fue de 99.1% (IC95%: 94.5–99.9 %). Esto quiere decir que, para poder estudiar las poblaciones silvestres de langostas, hay que considerar que por cada langosta visiblemente infectada existen otras tres langostas infectadas con quistes en lugares que no son evidentes a simple vista.

## Referencias

- Anderson RM, May RM (1978) Regulation and stability of host-parasite population interactions: I. Regulatory processes. *Journal of Animal Ecology* 47: 219–247.
- Alekseyenko OV, Kravitz EA (2015) Serotonin and the search for the anatomical substrate of aggression. *Fly* 8(4): 200–205.
- Altman DG, Bland JM (1994) Diagnostic test 1: sensitivity and specificity. *British Medical Journal* 308(6943): 1552.
- Atema J, Cobb JS (1980) Social behavior. In: Cobb JS, Phillips BF (eds.) *The Biology and Management of Lobsters*, vol 1. Academic Press, New York, pp. 409–450.
- Baisre JA (1964) Sobre los estadios larvales de la langosta común *Panulirus argus*. Centro de Investigaciones Pesqueras (Cuba). Contribución 19:1-37.
- Behringer DC, Butler MJ, Shields JD (2006) Avoidance of disease by social lobsters. *Nature* 441: 421.
- Behringer DC, Butler MJ, Shields JD (2011) Review of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) a decade after its discovery. *Diseases of Aquatic Organisms* 94: 153–156.
- Bekker C, Ohm RA, Loreto RG, Sebastian A, Albert I, Merrow M, Brachmann A, Hughes DP (2015) Gene expression during zombie ant biting behavior reflects the complexity underlying fungal parasitic behavioral manipulation. *BMG Genomics* 16: 620.
- Blair D, Limpus CJ (1982) Some digeneans (Platyhelminthes) parasitic in the loggerhead turtle *Caretta caretta* (L.), in Australia. *Australian Journal of Zoology* 30: 653–680.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2003) Factors affecting growth of the spiny lobsters *Panulirus gracilis* and *Panulirus inflatus* (Decapoda: Palinuridae) in Guerrero, Mexico. *Revista de Biología Tropical* 51: 165–174.
- Briones-Fourzán P, Castañeda-Fernandez de Lara V, Lozano-Álvarez E, Estrada-Olivo J (2003) Feeding ecology of the three juvenile phases of the spiny lobster *Panulirus argus* in a tropical reef lagoon. *Marine Biology* 142: 855–865.
- Briones-Fourzán P, Pérez-Ortiz M, Lozano-Álvarez E (2006) Defense mechanisms and antipredator behavior in two sympatric species of spiny lobsters, *Panulirus argus* and *P. guttatus*. *Marine Biology* 149: 227–239.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E, Negrete-Soto F, Barradas-Ortiz C (2007)

- Enhancement of juvenile Caribbean spiny lobsters: an evaluation of changes in multiple response variables with the addition of large artificial shelters. *Oecologia* 151: 401–416.
- Briones-Fourzán P, Ramírez-Zaldívar E, Lozano-Álvarez E (2008) Influence of conspecific and heterospecific aggregation cues and alarm odors on shelter choice by syntopic spiny lobsters. *Biological Bulletin* 215: 182–190.
- Briones-Fourzán P, Baeza-Martínez K, Lozano-Álvarez E (2009) Nutritional indices of juvenile Caribbean spiny lobsters in a Mexican reef lagoon: are changes over a 10-year span related to the emergence of *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1)? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 370: 82–88.
- Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2013) Essential habitats for *Panulirus* spiny lobsters. In: Phillips BF (ed.) *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture and Fisheries*, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Oxford, pp.186–122.
- Briones-Fourzán P, Muñoz de Cote-Hernández R, Lozano-Álvarez E (2016) Variability in prevalence of *Cymatocarpus solearis* (Trematoda, Brachycoeliidae) in Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* (Decapoda: Palinuridae) from Bahía de la Ascensión (Mexico). *Journal of Invertebrate Pathology* 137: 62-70.
- Briones-Fourzán P, Álvarez-Filip L, Barradas-Ortiz C, Morillo-Velarde P, Negrete-Soto F, Segura-García I, Sánchez-González A, Lozano-Álvarez E (2019) Coral reef degradation differentially alters feeding ecology of co-occurring congeneric spiny lobsters. *Frontiers in Marine Science* 5: 516.
- Bryan-Walker K, Leung TLF, Poulin R (2007) Local adaptation of immunity against trematode parasite in marine amphipod populations. *Marine Biology* 152: 687-965.
- Caballero y Caballero E (1959) Tremátodos de las tortugas de México. VII. Descripción de un tremátodo digéneo que parasita a tortugas marinas comestibles del Puerto de Acapulco, Guerrero. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México* 30: 159–166.
- Candia-Zulbarán R, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E, Barradas-Ortiz C, Negrete-Soto F (2015) Caribbean spiny lobsters equally avoid dead and clinically PaV1-infected conspecifics. *ICES Journal of Marine Science* 72: i164–i169.

- Cézilly F, Favrat A, Perrot-Minot MJ (2013) Multidimensionality in parasite-induced phenotypic alterations: ultimate versus proximate aspects. *Journal of Experimental Biology* 216: 27-35.
- Cheng TC, Provenza DV (1960) Studies on the trematode family Brachycoeliidae III. The subfamilies subordinate to the Brachycoeliidae and the status of the genus *Cymatocarpus* Looss, 1899. *American Midland Naturalist* 63: 162–168.
- Cheng TC (1986) General Parasitology, 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, New York.
- Chubb JC, Ball MA, Parker GA (2009) Living in intermediate hosts: evolutionary adaptations in larval helminths. *Trends in Parasitology* 26: 93–102.
- Ciaramella MA, Battison AL, Horney B (2014) Measurement of tissue lipid reserves in the American lobster (*Homarus americanus*): hemolymph metabolites as potential biomarkers of nutritional status. *Journal of Crustacean Biology* 34: 629–638.
- Cerenius L, Jiravanichpaisal P, Liu H, Söderhäll I (2010) Crustacean immunity. In Söderhäll K (ed.) *Invertebrate Immunity*, Springer series: Advances in experimental medicine and biology, New York, pp: 239-259.
- Cox C, Hunt JH, Lyons WG, Davis GE (1997) Nocturnal foraging of the Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus*) on offshore reefs of Florida, USA. *Marine and Freshwater Research* 48: 671–680.
- Cruz-Quintana Y (2012) Epizootiología de los patógenos *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) y *Cymatocarpus solearis* (Trematoda) en poblaciones de langosta espinosa *Panulirus argus* del Golfo de Batabanó, Cuba. Tesis doctoral. CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional, Mérida, México.
- Dall W (1974) Indices of nutritional state in the western rock lobster, *Panulirus longipes* (Milne Edwards). I. Blood and tissue constituents and water content. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 16: 167–180.
- Davies CE, Vogan CL, Rowley AF (2015) The effect of the copepod parasite, *Nicothoë astaci*, on haemolymph chemistry of the European lobster *Homarus gammarus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 113: 169–175.
- Davies CE, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2019) Untangling the effects of size, habitat and invertebrate biodiversity on parasite prevalence in the Caribbean spiny lobster. *Marine Biology* 166:113.

- Dollfus RP (1927) Parasitisme chez un pagure d'une larve de distome de tortue. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 91:1352–1355.
- Edwards DH, Kravitz EA (1997) Serotonin, social status and aggression. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 812-819.
- Fothergill-Gilmore LA, Michels PAM (1993) Evolution of glycolysis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 59(2): 105-235.
- Gérard C, Therón A (1997) Age/size-and time-specific effects of *Schistosoma mansoni* on energy allocation patterns of its snail host *Biomphalaria glabrata*. *Oecologia* 112: 447-452.
- Giraldes BW, Smyth DM (2016) Recognizing *Panulirus meripurpuratus* sp. nov. (Decapoda: Palinuridae) in Brazil—Systematic and biogeographic overview of *Panulirus* species in the Atlantic Ocean. *Zootaxa* 4107: 353–366.
- Goldstein JS, Matsuda H, Takenouchi T, Butler MJ (2008) The complete development of larval Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) in culture. *Journal of Crustacean Biology* 28(2): 306-327.
- Gómez del Prado-Rosas MC, Álvarez-Cadena, JN, Lamothe-Argumedo R, Grano-Maldonado MI (2003) *Cymatocarpus solearis*, a brachycoeliid metacercaria parasitizing *Panulirus argus* (Crustacea: Decapoda) from the Mexican Caribbean Sea. *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología* 74: 1-10.
- Gonzalez ST (2016) Influence of a trematode parasite (*Microphallus turgidus*) on grass shrimp *Palaemonetes pugio* response to refuge and predator presence. *Journal of Parasitology* 102: 646-649.
- Grano-Maldonado M, Álvarez-Cadena J (2010) In vitro cultivation of *Cymatocarpus solearis* (Brachycoeliidae) metacercarie to obtain adult stage without the marine turtle definitive host. *Korean Journal of Parasitology* 48(1):49-55.
- Gray H (1992) The western rock lobster, *Panulirus cygnus*: A natural history. Westralian Books, Geraldton, pp 112.
- Gutzler BC, Butler MJ (2017) Comparison of methods for determining nutritional condition in spiny lobsters. *Journal of Shellfish Research* 36: 175-179.

- Hansen EK, Poulin R (2005) Impact of a microphallid trematode on the behavior and survival of its isopod intermediate host: phylogenetic inheritance? *Parasitology Research* 97, 242–246.
- Harrel EF (2019) Hmisc: Harrel Miscellaneous. R package version 4.2-0.  
<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/Hmisc>
- Helluy S, Thomas F (2010) Parasitic manipulation and neuroinflammation: Evidence from the system *Microphallus papillorobustus* (Trematoda) – *Gammarus* (Crustacea). *Parasites and Vectors* 3:38.
- Herrera-Salvatierra N, Pascual-Jimenez C, Huchin-Mian JP, Lozano-Álvarez E, Montero-Muñoz J, Briones-Fourzán P, Rodríguez-Canul R (2019) Nutritional and immunological evaluation of juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae) naturally infected with PaV1 virus. *Journal of Crustacean Biology* 39: 162–171.
- Herrnkind WF, Childress MJ, Lavalli KL (2001) Cooperative defence and other benefits among spiny lobsters: inferences from group size and behaviour. *Marine and Freshwater Research* 52: 1113-1124.
- Holmes JC, Zohar H (1990) Pathology and host behaviour. Taylor and Francis, Londres, pp. 34-64.
- Hoover K, Grove M, Gardner M, Hughes DP, McNeil J, Slavicek J (2011) A gene for an extended phenotype. *Science* 333 (6048):1401
- Horner AJ, Nickles SP, Weissburg MJ, Derby CD (2006) Source and specificity of chemical cues mediating shelter preference of Caribbean spiny lobsters (*Panulirus argus*). *Biological Bulletin* 211: 128–139.
- Horner AJ, Weissburg MJ, Derby CD (2008) The olfactory pathway mediates sheltering behavior of Caribbean spiny lobsters, *Panulirus argus*, to conspecific urine signals. *Journal of Comparative Physiology A* 194: 243–253.
- Huber R, Smith K, Delago A, Isaksson K, Kravitz EA (1997) Serotonin and aggressive motivation in crustaceans: Altering the decision to retreat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 5939-5942.

- Huchin-Mian JP, Rodríguez-Canul R, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E (2013) *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) infection prevalence and risk factors in a Mexican lobster fishery employing casitas. *Diseases of Aquatic Organisms* 107: 87-97.
- Hunt JH, Lyons WG. (1986) Factors affecting growth and maturation of spiny lobsters, *Panulirus argus*, in Florida Keys. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43: 2243-2247.
- James CT, Noyes KJ, Stumbo AD, Wisenden BD, Goater CP (2008) Cost of exposure to trematode cercariae and learned recognition and avoidance of parasitism risk by fathead minnows *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology* 73:2238–2248.
- Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Soderhall K (2000) Crustacean hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191:45–52.
- Koehler AV & Poulin R (2010) Host partitioning by parasites in an intertidal crustacean community. *Journal of Parasitology* 96: 862–868.
- Krause J, Ruxton GD, Godin JGJ (1999) Distribution of *Crassiphiala bulboglossa*, a parasitic worm, in shoaling fish. *Journal of Animal Ecology* 68:27–33.
- Kravitz EA (1988) Hormonal control and behavior: amines and the biasing of behavioral output in lobsters. *Science* 241(4874): 1775-1781.
- Krebs HA, Johnson WA (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4: 148-156.
- Kunz AK, Pung OJ (2004) Effects of *Microphallus turgidus* (Trematoda: Microphallidae) on the predation, behavior, and swimming stamina of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Journal of Parasitology* 90: 441–445.
- Kwok R, Tobe S (2006) Hemolymph clotting in crustaceans: Implications for neuropeptide extraction from invertebrate hemolymph. *Peptides* 27: 590-596.
- Lafferty KD, Shaw JC (2013) Comparing mechanisms of host manipulation across host and parasite taxa. *Journal of Experimental Biology* 216: 56-66.
- Larson OR, Uglem GL, Lee KJ, (1988) Fine structure and permeability of the metacercarial cyst wall of *Clinostomum marginatum* (Digenea). *Parasitology Research* 74(4): 352-355.
- Latham ADM, Poulin R (2002) Field evidence of the impact of two acanthocephalan parasites on the mortality of three species of New Zealand shore crabs (Brachyura). *Marine Biology* 141(6): 1131–1139.



- Lee SY, Söderhall K (2002) Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology* 12: 421-437.
- Lettini SE, Sukhdeo MVK (2010) The energetic cost of parasitism in Isopods. *Ecoscience* 17: 1-8.
- Li C, Shields JD, Ratzlaff RE, Butler MJ (2008) Pathology and hematology of Caribbean spiny lobsters experimentally infected with *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *Virus Research* 132: 104–113.
- Libersat F, Delago A, Gal R (2009) Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. *Annual Review of Entomology* 54:189–207.
- Libersat F, Kaiser M, Emanuel S (2018) Mind control: how parasites manipulate cognitive functions in their insect hosts. *Frontiers in Psychology* 9: 572.
- Linton E (1910) Helminth fauna of the Dry Tortugas. II. Trematodes. *Publications of the Carnegie Institute Washington* 133: 11–98.
- Loker ES (1994) On being a parasite in an invertebrate host: a short survival course. *Journal of Parasitology* 80: 728–747.
- Lorenzon S, Martins M, Ferrero EA (2011) Ecological relevance of hemolymph total protein concentration in seven unrelated crustacean species from different habitats measured predictively by a density-salinity refractometer. *Journal of Marine Biology* 2011: 153654.
- Lozano-Álvarez E, Luviano-Aparicio N, Negrete-Soto F, Barradas-Ortiz C, Aguiñiga-García S, Morillo-Velarde PS, Álvarez-Filip L, Briones-Fourzán P (2017) Does reef architectural complexity influence resource availability for a large reef-dwelling invertebrate? *Journal of Sea Research* 128: 84–91.
- Lozano-Álvarez E, Cid-González LN, Candia-Zulbarán RI, Negrete-Soto F, Barrada-Ortiz C, Briones-Fourzán P (2018) Avoiding disease vs avoiding predation: testing the trade-off in *Panulirus argus*. *Bulletin of Marine Science* 94: 657-674.
- Lyle WG, MacDonald CD (1983) Molt stage determination in the Hawaiian spiny lobster *Panulirus marginatus*. *Journal of Crustacean Biology* 3: 208-216.
- MacDiarmid AB, Oliver MD, Stewart RA, Gopal D (2005) Conservation of unique patterns of body markings at ecdysis enables identification of individual spiny lobster, *Jasus edwardsii*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 39: 551-555.

- Marangi M, Carlino P, Profico C, Olivieri V, Totaro G, Furi G, Marzano G, Papini RA (2020) First multicenter coprological survey on helminth parasite communities of free-living loggerhead sea turtles *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) from the Adriatic Sea and Northern Ionian Sea. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife* 11: 207 – 212.
- Marcogliese DJ (2004) Parasites: small players with crucial roles in the ecological theater. *EcoHealth* 1: 151-164.
- Mayack C, Naug D (2010) Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology* 56: 1572–1575.
- Montes M, Plaul S, Croci Y, Waldbillig M, Ferrari W, Topa E, Martorelli S (2020). Pathology associated with three new *Clinostomum* metacercariae from Argentina with morphological and DNA barcode identification. *Journal of Helminthology* 94: 1-11.
- Montgomery-Fullerton MM, Cooper RA, Kauffman KM, Shields JD, Ratzlaff RE (2007) Detection of *Panulirus argus* Virus 1 in Caribbean spiny lobsters. *Diseases of Aquatic Organisms* 76: 1-6.
- Moore J (2002) Parasites and the behavior of animals. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University Press, Oxford.
- Newcombe RG (1998) Two-side confidence intervals for single proportion: Comparison of seven methods. *Statistics in Medicine* 17:857-872.
- Oliver MD, MacDiarmid AB (2001) Blood refractive index and ratio of weight to carapace length as indices of nutritional condition in juvenile rock lobsters (*Jasus edwardsii*). *Marine and Freshwater Research* 52:1395–1400.
- Overli O, Pall M, Borg B, Jobling M, Winberg S (2001) Effects of *Schistocephalus solidus* infection on brain monoaminergic activity in female three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus*. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences* 268:1411–1415.
- Pascual-Jiménez C, Huchin-Mian JP, Simões N, Briones-Fourzán P, Lozano-Álvarez E, Sánchez- Arteaga A, Pérez-Vega JA, Simá-Álvarez R, Rosas-Vázquez C, Rodríguez-Canul R (2012) Physiological and immunological characterization of Caribbean spiny lobsters naturally infected with *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *Diseases of Aquatic Organisms* 100: 113–124.

- Pérez-Campos RA, Rodríguez-Canul R, Pérez-Vega JA, González-Salas C, Guillén-Hernández S (2012) High serotonin levels due to the presence of the acanthocephalan *Hexaglandula corynosoma* could promote changes in behavior of the fiddler crab *Uca spinicarpa*. *Diseases of Aquatic Organisms* 99: 49-55.
- Pestal GP, Taylor DM, Hoening JM, Shields JD, Pickavance R (2003) Monitoring the prevalence of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* sp. in snow crabs *Chionoecetes opilio* from Conception Bay, Newfoundland. *Diseases of Aquatic Organisms* 53: 67-75.
- Phillips BF, Melville-Smith R, Kay MC, Vega-Velázquez A (2013) *Panulirus* species. In: Phillips BF (ed.) *Lobsters: Biology, Management, Aquaculture, and Fisheries*, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Oxford. pp. 289–325.
- Poulin R, Cribb TH (2002) Trematode life cycles: short is sweet? *Trends in Parasitology* 18: 176-183.
- R Core Team (2019) The R stats package. R package version 3.6.1.
- Ratchford SG, Eggleston DB (1998) Size- and scale-dependent chemical attraction contribute to an ontogenetic shift in sociality. *Animal Behaviour* 56: 1027–1034.
- Raza MF, Su S (2019) Differential roles for dopamine d1-like and d2-like receptors in learning and behavior of honeybee and other insects. *Applied Ecology and Environmental Research* 18(1): 1317-1327.
- Rebolledo M, Landaeta MF, Muñoz G (2014) Efecto del endoparásito *Proisorhynchoides* sp. (Trematoda: Bucephalidae) en la capacidad de nado sostenido del baunco *Girella laevifrons* (Osteichthyes: Kyphosidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49: 625-630.
- Schneider R, Baumann A, Blenau W (2006) Aminergic control and modulation of honeybee behaviour. *Current Neuropharmacology* 4(4): 259-276.
- Shabani S, Kamio M, Derby CD (2009) Spiny lobsters use urine-borne olfactory signaling and physical aggressive behaviors to influence social status of conspecifics. *Journal of Experimental Biology* 212: 2464-2474.
- Shields JD, Behringer DC (2004) A new pathogenic virus in Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 109-118.
- Shields JD (2011) Diseases of spiny lobsters: a review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106: 79-91.

- Sousa WP (1983) Host life history and effect of parasitic castration on growth: A field study of *Cerithidea californica* Haldeman (Gastropoda Prosobranchia) and its trematode parasites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 73: 273–296.
- Stentiford G, Douglas N, Albalat A, Milligan R, Bailey N (2015) The effect of parasitic infection by *Hematodinium* sp. on escape swimming and subsequent recovery in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). *Journal of Crustacean Biology* 35: 1-10.
- Stier T, Drent J, Thieltges WD (2015) Trematode infections reduce clearance rates and condition in blue mussels *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 529: 137–144.
- Travis DF (1954) The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. I. Molting and growth in laboratory-maintained individuals. *Biological Bulletin* 107: 433-450.
- Thomas F, Poulin R, Brodeur J (2010) Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* 119: 1217-1223.
- Threlfall W (1979) Three species of digenean from the Atlantic leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Canadian Journal of Zoology* 57:1825–1829.
- Werneck MR, Lima EHSM, Pires T, da Silva RJ (2015) Helminth parasites of the Hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* (Testudines, Cheloniidae) in Brazil. *Journal of Parasitology* 101: 500-503.
- Wisenden BD, Goater B, James CT (2009) Behavioral defenses against parasites and pathogens. In: Zaccane G, Perriere C, Mathis A, Kapoor BG (Eds), *Fish Defenses, Pathogens, Parasites and Predators*, vol. 2. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 151-168.

## Anexos

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO CON KIT COMERCIAL WIZARD GENOMIC (PROMEGA®)

1. Tomar 250 µl de muestra (hemolinfa en etanol al 96%), centrifugar a 13,000 g por 3 min, cuidadosamente decantar el sobrenadante y secar el precipitado por 30 min.
2. Adicionar 223 µl del mix a cada muestra (*para 24 muestras: 4800 µl de solución de lisado (Nuclei Lysis solution), 480 µl de proteinasa K, más 72 µl de RNAsa*)
3. Incubar en baño seco durante 3 horas (o mejor, toda la noche) a 55°C. Cada hora agitar en el vortex hasta que el tejido esté completamente lisado.
4. Adicionar 100 µl de solución precipitadora de proteínas (Protein precipitation solution) a la muestra. Agitar con el vortex durante 20 segundos, luego sumergir el tubo completamente en hielo durante 10 minutos

(Mientras tanto, etiquetar tubos eppendorf estéril de 1.5 ml nuevos, y añadir 350 µl de isopropanol a cada tubo).

5. Después de 10 minutos, centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm, el precipitado proteínico forma un pellet de color blanco.
6. Recuperar el sobrenadante, **este contiene el ADN**, cuidadosamente con una pipeta tratando de no tomar el precipitado. Transferir el sobrenadante a los tubos con isopropanol.
7. Mezclar suavemente invirtiendo el tubo, (el ADN se observa como filamentos de color blanco).
8. Centrifugar durante 2 minutos a 13000 rpm, cuidadosamente decantar el sobrenadante (**el precipitado es el ADN**)
9. Añadir 500 µl de etanol al 70 %, mezclar suavemente invirtiendo el tubo varias veces.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos.
11. Cuidadosamente decantar el etanol e invertir el tubo sobre papel limpio absorbente hasta que el pellet esté completamente seco (~2-3 horas o toda la noche).
12. Añadir 100 µl de amortiguador de rehidratación (TE) o agua destilada libre de endonucleasas.

13. Si necesitas procesar las muestras inmediatamente, incubar a 65°C por 1 hora para rehidratar, agitando después o almacenar el ADN a 4°C durante la noche, agitando después.

14. Guardar en el congelador a -20°C.

#### **Preparación de Gel de agarosa 1.5% con Gel Green**

1. Tarar la microbáscula con el aluminio sobre el cual se va a pesar la agarosa.
2. Pesar 1.8 gr de agarosa y poner en el vaso para geles.
3. Añadir 120 mL de buffer TAE 1X.
4. Colocar la taba sin apretar, apenas enroscada.
5. Colocar en el microondas por 30 seg o hasta que empiece a hervir. Cuando comience a hervir detener el microondas, sacar el frasco con un guante de cocina y mover suavemente para que se disuelva la agarosa. Repetir tantas veces sea necesario para que toda la agarosa se disuelva.
6. Dejar enfriar 10 minutos aprox.
7. Preparar el molde deseado con los peines debidamente colocados (no deben tocar el fondo, el molde debe de dejarse en una base plana).
8. Agregar 3 µl de GelGreen 10,000X al TAE con agarosa mientras siga caliente y mezclar suavemente moviendo el frasco.
9. Verter en el molde y dejar enfriar hasta que el gel se haya solidificado (de coloración nublada en lugar de transparente).

#### **Preparación de Buffer TAE 1X.**

1. Verter 75 mL de buffer TAE 40X de grado de biología molecular.
2. Aforar con agua destilada hasta completar 3 L y mezclar.
3. Verter en el frasco para buffer.
4. Etiquetar debidamente (cuándo se preparó y por quién).

#### **Preparación de stock de dNTPs para PCR.**

1. En un tubo Eppendorf de 0.5 mL agregar 10 µl de cada dNTP (dTTP, dATP, dCTP y dGTP) para un total de 40µl de dNTPs.
2. Agragar 60 µL de agua libre de nucleasas (grado molecular) y mezclar con la pipeta.

#### **Preparación de oligos 20 mM para PCR**

1. En un tubo Eppendorf de 0.5 ml agregar 20 µl de oligo F resuspendido a 100 mM.
2. Agregar 80 µl de agua libre de nucleasas (bidestilada y esterilizada) y mezclar.

Hacer lo mismo para el oligo R, estos stocks pueden ser guardados a -20°C y ser utilizados para futuras reacciones si no han sido contaminados.

## Preparación de Mastermix para PCR

	1 reacción de PCR (9 $\mu$ l)	30 reacciones de PCR (270 $\mu$ l)
Buffer de carga (verde)	1.2	36
Agua libre de nucleasas	5.54	166.2
Oligo F 20 mM	0.4	12
Oligo R 20 mM	0.4	12
MgCl <sub>2</sub>	1	30
DNTPs stock	0.4	12
Promega GoTaq Pol	0.06	1.8

Colocar 9  $\mu$ l de mezcla en cada tubito para PCR.

Una vez colocados todos agregar 1  $\mu$ l de ADN de muestra a cada tubito de tal forma que la reacción tiene un volumen final de 10 $\mu$ l.

Agregar 1  $\mu$ l de agua bidestilada estéril al control negativo.

Agregar 1  $\mu$ l del control positivo (muestra que se sabe tiene el virus) al control positivo.

NOTA: Al cargar el gel no olvidar también cargar el ladder, dicen que no es necesario, pero en caso de que el gel corra mal, haya algún problema al correr el gel se puede ver eso utilizando el ladder que siempre va a aparecer incluso si ninguno de las muestras elonga. Si no hay carriles en suficientes en el gel pueden usarse el ladder.

## Preparación de Mastermix para ser guardado a -20°C (SIN ADN y SIN taqPOL)

1. En un tubo Eppendorf de 1.5 ml agregar lo siguiente.

	5 x 30 reacciones de PCR (1341 $\mu$ l) sin AND o Taq
Buffer de carga (verde)	180
Agua libre de nucleasas	831
Oligo F (20mM)	60
Oligo R (20mM)	60
MgCl <sub>2</sub>	150
dNTPs	60

Tomar 268.2  $\mu$ l del mastermix y agregarle 1.8  $\mu$ l de Taq Polimerasa (la polimerasa siempre debe de mantenerse en frío) y mezclar utilizando la pipeta.

NOTA: Recuerda siempre después de descongelar el Mastermix que esté bien descongelado y mezclar antes de tomar lo necesario para el experimento.



## **PROCOLO DE CONTEO CELULAR**

1. Llenar jeringas de 5 ml con 3 ml de SIL.
2. Limpiar la superficie del animal donde se va a extraer con alcohol al 70%.
3. Extraer 1 ml de hemolinfa de la langosta entre el 4<sup>to</sup> y 5<sup>to</sup> par de pereiópodos (llenar la jeringa hasta la marca de 4 ml).
4. Agitar bien la jeringa para evitar coagulación de la hemolinfa.
5. Rotular dos tubos eppendorf de 1.5 ml con número perteneciente a la langosta.
6. Pasar le hemolinfa en SIL de la jeringa a 2 tubos eppendorf de 1.5 ml distribuido equitativamente (se pierde 1ml).
7. Centrifugar los tubos a 4G durante.
8. Rotular otro par de tubos con el número de langosta.
9. Pasar el sobrenadante a los dos tubos eppendorf rotulados.
10. Resuspender el pellet celular en 375 ul de SIL para realizar conteo de hemocitos.
11. Una vez resuspendido el pellet tomar 20 ul y colocar 10 ul en cada cámara del hemocitrómetro (cámara de Neubauer).
12. Observar al microscopio y contar número de células en cada cuadrante. Si la densidad de los hemocitos sigue siendo demasiado alta hacer una segunda dilución y volver al paso 11.

Cálculo: # de células vivas/4 x factor de disolución x 10,000 = # de células en 1 mL

### Material necesario:

- Jeringas de 5 ml.
- SIL.
- Tubos eppendorf de 1.5ml.
- Micropipetas.
- Cámara de Neubauer.
- Cubreobjetos.
- Puntas
- Microscopio.
- Plumón
- Lápiz.
- Hojas para los datos.

## **Protocolo de medición de glucosa**

1. Sacar los reactivos del kit y dejarlos a que se atemperen a temperatura ambiente.
2. Mezclar suavemente los frascos invirtiéndolos lentamente.
3. En una placa nueva de 96 pocillos nueva colocar 210 µl de agua destilada en el primer pozo.
4. En el segundo pozo no colocar nada.
5. En el tercer pozo colocar 210 µl del reactivo R como blanco.
6. Colocar en el resto de los pocillos 200 µl del reactivo R.
7. Colocar en el cuarto pocillo 10 µl del reactivo de calibración de glucosa (Glucose CAL) como patrón y mezclar suavemente con la micropipeta.
8. Colocar 10 µl de muestra de suero de langosta en SIL en su respectivo pocillo (pocillos 5 a 96) y mezclar con la micropipeta. Se recomienda cada muestra tomarla por duplicado o triplicado.
9. Incubar 10 minutos a 37°C o 30 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
10. Medir a 505nm (490-550).
11. Ajustar el espectrofotómetro a cero usando el pocillo de agua destilada.
12. Leer absorbancia (A). El color es estable como mínimo 30 minutos.
13. Repetir pasos 3 a 12 en cada placa individual (cada placa tiene su propio blanco y patrón).

Cálculos:

Obtener promedio de las repeticiones de la misma muestra y usar ese promedio como (A) de la muestra.

$((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Aire}) / ((A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Aire}) * \text{concentración del patrón} = \text{mg/dl de glucosa}$

También se puede calcular utilizando una curva de calibración por regresión lineal.

## **Protocolo de medición de colesterol**

1. Sacar los reactivos del kit y dejarlos a que se atemperen a temperatura ambiente.
2. Mezclar suavemente los frascos invirtiéndolos lentamente.
3. En una placa nueva de 96 pocillos nueva colocar 210 µl de agua destilada en el primer pozo.
4. En el segundo pozo no colocar nada.
5. En el tercer pozo colocar 210 µl del reactivo R como blanco.
6. Colocar en el resto de los pocillos 200 µl del reactivo R.
7. Colocar en el cuarto pocillo 10 µl del reactivo de calibración de colesterol (Cholesterol CAL) como patrón y mezclar suavemente con la micropipeta.
8. Colocar 10 µl de muestra de suero de langosta en SIL en su respectivo pocillo (pocillos 5 a 96) y mezclar con la micropipeta. Se recomienda cada muestra tomarla por duplicado o triplicado.
9. Incubar 5 minutos a 37°C o 15 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
10. Medir a 505nm (490-550).
11. Ajustar el espectrofotómetro a cero usando el pocillo de agua destilada.
12. Leer absorbancia (A). El color es estable como mínimo 60 minutos.
13. Repetir pasos 3 a 12 en cada placa individual (cada placa tiene su propio blanco y patrón).

Cálculos:

Obtener promedio de las repeticiones de la misma muestra y usar ese promedio como (A) de la muestra.

$$\frac{((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Aire})}{((A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Aire})} \times \text{concentración del patrón} = \text{mg/dl de colesterol}$$

También se puede calcular utilizando una curva de calibración por regresión lineal.

## **Protocolo de medición de proteína total**

1. Sacar los reactivos del kit y dejarlos a que se atemperen a temperatura ambiente.
2. Mezclar suavemente los frascos invirtiéndolos lentamente.
3. En una placa nueva de 96 pocillos nueva colocar 250 µl de agua destilada en el primer pozo.
4. En el segundo pozo no colocar nada.
5. En el tercer pozo colocar 250 µl del reactivo R como blanco.
6. Colocar en el resto de los pocillos 245.5 µl del reactivo R.
7. Colocar en el cuarto pocillo 2.5 µl del reactivo de calibración de proteína total (T Protein CAL) como patrón y mezclar suavemente con la micropipeta.
8. Colocar 2.5 µl de muestra de suero de langosta en SIL en su respectivo pocillo (pocillos 5 a 96) y mezclar con la micropipeta. Se recomienda cada muestra tomarla por duplicado o triplicado.
9. Medir a 540nm (530-550).
10. Ajustar el espectrofotómetro a cero usando el pocillo de agua destilada.
11. Leer absorbancia (A). El color es estable como mínimo 30 minutos.
12. Repetir pasos 3 a 11 en cada placa individual (cada placa tiene su propio blanco y patrón).

Cálculos:

Obtener promedio de las repeticiones de la misma muestra y usar ese promedio como (A) de la muestra.

$$\frac{((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Aire})}{((A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Aire})} \times \text{concentración del patrón} = \text{mg/dl de colesterol}$$

También se puede calcular utilizando una curva de calibración por regresión lineal.

## **Protocolo de medición de albúmina**

1. Sacar los reactivos del kit y dejarlos a que se atemperen a temperatura ambiente.
2. Mezclar suavemente los frascos invirtiéndolos lentamente.
3. En una placa nueva de 96 pocillos nueva colocar 250 µl de agua destilada en el primer pozo.
4. En el segundo pozo no colocar nada.
5. En el tercer pozo colocar 250 µl del reactivo R como blanco.
6. Colocar en el resto de los pocillos 245.5 µl del reactivo R.
7. Colocar en el cuarto pocillo 2.5 µl del reactivo de calibración de albúmina (Albumin CAL) como patrón y mezclar suavemente con la micropipeta.
8. Colocar 2.5 µl de muestra de suero de langosta en SIL en su respectivo pocillo (pocillos 5 a 96) y mezclar con la micropipeta. Se recomienda cada muestra tomarla por duplicado o triplicado.
9. Medir a 630nm (600-650).
10. Ajustar el espectrofotómetro a cero usando el pocillo de agua destilada.
11. Leer absorbancia (A). El color es estable como mínimo 30 minutos.
12. Repetir pasos 3 a 11 en cada placa individual (cada placa tiene su propio blanco y patrón).

Cálculos:

Obtener promedio de las repeticiones de la misma muestra y usar ese promedio como (A) de la muestra.

$$\frac{((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Aire})}{((A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Aire})} * \text{concentración del patrón} = \text{mg/dl de colesterol}$$

También se puede calcular utilizando una curva de calibración por regresión lineal.

## **Protocolo de ELISA cuantificativo para dopamina con Kit ALPCO**

1. Diluir los 20 ml de buffer de lavado concentrado con agua destilada, desionizada o ultra-pura hasta un volumen total de 1 l.
2. Reconstituir el frasco de enzima con 1 ml de agua y mezclar. Agregar 0.3 ml del frasco de coenzima y 0.7 ml de buffer de ajuste para un volumen total de 2 ml.
3. Pipetear 10µl de las soluciones patrón y controles y 300 µl de las muestras de plasma en sus respectivos pozos en la placa de extracción.
4. Agregar 250 µl de agua a los pozos con soluciones patrón y control.
5. Pipetear 50 µl del buffer de ensayo a cada pozo.
6. Pipetear 50 µl del buffer de extracción a cada pozo.
7. Cubrir placa con la hoja adhesiva e incubar 30 min a temperatura ambiente en un shaker a aprox 600 rpm.
8. Remover hoja adhesiva y secar la placa invirtiéndola sobre material absorbente.
9. Pipetear 1 ml de buffer de lavado a cada pozo e incubar 5 min sobre el shaker a 600 rpm aprox y secar la placa usando papel absorbente.
10. Repetir paso 9.
11. Pipetear 150 µl de buffer de acilación a los pozos.
12. Pipetear 25 µl de reactivo de acilación a los pozos.
13. Incubar 15 min en un shaker a 600 rpm.
14. Secar placa invirtiendo sobre papel absorbente.
15. Repetir paso 9.
16. Pipetear 175 µl de ácido clorhídrico a los pozos.
17. Cubrir placa con el papel adhesivo e incubar por 10 minutos en shaker a 600rpm.
18. Remover papel y descartar EL PAPEL, no el sobrenadante.
19. Pipetear 25 µl de la solución enzimática (paso 3) a los pozos de la placa de microtitulación de dopamina.
20. Pipetear 25 µl de los patrones, controles y muestras extraídos en la placa de extracción a su pozo correspondiente en la placa de microtitulación de dopamina.
21. Agregar 25 µl de ácido clorhídrico a los patrones y controles.
22. Incubar 30 min a temperatura ambiente sobre shaker a 600 rpm.

23. Pipetear 50  $\mu\text{l}$  de antisuero de dopamina a todos los pozos y cubrir con papel adhesivo.
24. Incubar 2 h a temperatura ambiente en shaker.
25. Descartar sobrenadante y lavar cada pozo 3 veces con 300  $\mu\text{l}$  de buffer de lavado y secando cada vez.
26. Pipetear 100  $\mu\text{l}$  de conjugado enzimatico a los pozos.
27. Incubar 30 min a temperatura ambiente en shaker.
28. Repetir paso 25.
29. Pipetear 100  $\mu\text{l}$  de substrato a cada pozo en incubar 25 minutos sobre el shaker y evitar exponer a luz del sol directa.
30. Agregar 100  $\mu\text{l}$  de solución de alto y asegurarse de homogenización de la solución.
31. Leer absorbancia inmediatamente antes de que hayan pasado 10 minutos a 450 nm con valor de referencia entre 620 y 650 nm si se puede.

Utilizar una regresión no lineal para crear la curva de patrón con las lecturas de los patrones y comparar con los controles para asegurar calidad del ensayo.

## **Protocolo de ELISA cuantificativo para serotonina con Kit ALPCO**

1. Diluir 20 ml de buffer de lavado utilizando agua desionizada, destilada o ultra pura hasta un volumen final de 1 l.
2. Asegurarse de que el reactivo de acilación se encuentre líquido y homogéneo ya que tiene un punto de congelamiento de 18.5 °C. Dejar al menos 2 h a temperatura ambiente e invertir suavemente.
3. Pipetear 25 µl de los patrones, controles y muestras a su tubo de reacción respectivo.
4. Agregar 500 µl de buffer de acilación a todos los tubos.
5. Agregar 25 µl de reactivo de acilación a todos los tubos.
6. Mezclar bien e incubar 15 min a temperatura ambiente (TA).
7. Pipetear 25 µl de los patrones, controles y muestras acilados a sus pozos correspondientes en la placa de microtitulación de serotonina.
8. Pipetear 100 µl de antisuero de serotonina a cada pozo.
9. Incubar 30 min a TA en shaker a 600 rpm aprox, en caso de no tener shaker agitar suavemente con la mano e incubar 1 h a TA.
10. Descartar o aspirar los contenidos de cada pozo y lavar tres veces agregando 300 µl del buffer de lavado, descartando y secando invirtiendo la placa sobre papel absorbente.
11. Pipetear 100 de la solución de conjugado a cada pozo.
12. Incubar 15 a TA en shaker a 600 rpm o sin shaker.
13. Repetir paso 10.
14. Pipetear 100 del substrato a cada pozo.
15. Incubar 15 minutos a TA en shaker o sin shaker. Evitar exponer a luz del Sol directa.
16. Agregar 100 µl de la solución de alto a cada pozo y agitar bien para asegurar una mezcla homogénea.
17. Leer absorbancia inmediatamente antes de que hayan pasado 10 minutos a 450 nm usando una longitud de onda de referencia entre 620 y 650 nm de ser posible.

Utilizar una regresión no lineal para crear la curva de patrón con las lecturas de los patrones y comparar con los controles para asegurar calidad del ensayo.