



Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas



Departamento de Desarrollo de Tecnologías

Efecto de la ablación del pedúnculo ocular sobre las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol, glucosa, lactato, proteína, profenoloxidasa y fenoloxidasa en el camarón blanco

Litopenaeus vannamei.

T e s i s

que para obtener el grado de maestro en ciencias
con la especialidad en el manejo de recursos marinos

p r e s e n t a

Juan Carlos Sainz Hernández

La Paz Baja California Sur, Mayo de 1999

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

Indice

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Abreviaturas	iii
Lista de figuras	iv
Resumen	v

Capitulo I

Introducción	2
Antecedentes	4
Justificación	15
Objetivo	17

Capitulo II

Material y método	19
Animales , traslado y mantenimiento	19
Marcado y reconocimiento	19
Ablación del pedúnculo ocular	20
Obtención de hemolinfa	20
Contéo y separación de hemocitos	22
Medición de profenoloxidasa y fenoloxidasa	22
Medición de metabolitos	23
Análisis estadístico	25

Capitulo IIJ

Resultados	27
------------	----

Capitulo IV

Discusión	37
Conclusiones	46
Referencias	49

Abreviaturas

C	Digase a organismos controles
U	Digase a organismos ablacionados unilateralmente
B	Digase a organismos ablacionados bilateralmente
OY	Organo Y
OXSG	Complejo organo X y el seno de la glandula
CHH	Hormona hiperglicemiente de crustaceos
VIH	Hormona inhibidora de la vitelogenesis
MIH	Hormona inhibidora de la muda
NDH	Hormona neurodepresora
NHT	Numero de hemocitos totales
pEApFO	Proenzima activadora de la profenoloxidasa
EApFO	Enzima activadora de la profenoloxidasa
pFO	Profenoloxidasa
FO	Fenoloxidasa
LPS	Lipopolisacaridos
PG	β-glucanos
PG	Peptido-glucanos

Lista de Figuras y Tablas

Fig 1.	Secuencia llevada al <u>cabó</u> para procesar las muestras. - - - - -	21
Fig 2.	Duración del ciclo de muda en el camarón blanco <i>L. vanamei</i> . (U) ablación unilateral, (B) ablación bilateral y (C) controles. - - - - -	28
Fig 3.	Concentración de triglicéridos y colesterol en mg/dl de plasma del camarón blanco <i>L. vanamei</i>. - - - - -	31
Fig 4.	Concentración de glucosa, y lactato en mg/dl de plasma del camarón blanco <i>L. vanamei</i>. - - - - -	32
Fig 5.	Concentración de proteína en mg/dl de plasma del camarón blanco <i>L. vanamei</i>. - - - - -	33
Fig 6.	Número de hemocitos y actividad total de la profenoloxidasa celular, en el camarón blanco <i>L. vannamei</i>. - - - - -	34
Fig 7.	Actividad total de la profenoloxidasa en plasma y fenoloxidasa, en el camarón blanco <i>L. vannamei</i>. - - - - -	35
Tabla 1.	Método empleado para medir los metabolitos en microplaca. - - - - -	23
Tabla 2.	Porciento de mortalidad ocurrida en cada uno de los grupos tratados por sexos, durante el periodo de ablacion y durante el proceso de muda siguiente a la ablación. - - - - -	27

Resumen

La ablacion del tallo ocular para inducir una maduracion gonadica en crustaceos, es la practica mas comun en **los** laboratorios de **producción** de nauplios de Penaeidos. A **parte** de la **reproducción**, otros procesos fisiologicos y metabolicos son afectados por la **remoción** de la **glándula** neuroendocrina complejo **órgano X** y su seno de la **glándula**. En este estudio se investigo la influencia de la ablacion del tallo ocular **sobre** las concentraciones de trigliceridos, de glucosa, de lactato, de colesterol y de proteina en el plasma. Por otro **lado**, la actividad total de la profenoloxidada celular y plasmatica, fenoloxidasa plasmatica y el numero total de hemocitos tambien **fueron** analizados. Se compararon **grupos** de machos y **hembras** en estadio de **intermuda** ablacionados unilateralmente, bilateralmente y controles. Se aplico una ANDEVA de dos **vías** para **analizar** el efecto de **los** sexos y el **tratamiento seguido** de un **análisis** de comparacion de medias. Se **observó** una **interacción** significativa en la concentracion de glucosa en el plasma, lo **cual** significa una diferencia en el metabolismo de la glucosa entre machos y **hembras**. La concentracion de glucosa es significativamente mas alta en machos ablacionados unilateralmente con **respecto** a **los** bilaterales. Las **hembras** unilaterales y bilaterales presentaron una tendencia por concentraciones mas bajas. Se **detectó** una **interacción** significativa en la concentracion de trigliceridos en el plasma, lo **cual** significa una diferencia en el metabolismo de **los** trigliceridos entre machos y **hembras**. La concentracion de trigliceridos en **hembras** ablacionadas unilateralmente **fue** significativamente mas baja con **respecto** a **los** controles. Se observo **una** interaccion significativa en la concentracion de proteina en el plasma, lo **cual** significa una diferencia en el metabolismo de la proteina entre machos y **hembras**. La concentracion de proteina **fue** mas baja en machos unilaterales, mientras que en **hembras** unilaterales la concentracion **fue** mas alta con **respecto** a **los** controles. Con **respecto** al lactato, en ambos sexos ablacionados unilateralmente, la concentracion **fue** significativamente mas alta con **respecto** a **los** bilaterales, **también** el lactato mostro concentraciones significativamente **más** altas en las **hembras** (tratadas y controles) con **respecto** a **los** machos. No se observaron cambios significativos en la concentracion de colesterol y en el numero de hemocitos **totales**. La actividad total de la profenoloxidasa celular mostro una actividad total significativamente mas alta en **los** machos (tratados y

controles) con **respecto** a las **hembras**. En **ambos** sexos ablacionados bilateralmente, la actividad total de la profenoloxidasas plasmática **fue** significativamente más baja con **respecto** a **los** controles. En **los** organismos ablacionados unilateralmente, la actividad total de la fenoloxidasas **fue** significativamente más alta con **respecto** a **los** bilaterales. Se **observó** un **decremento significativo** en el periodo del ciclo de muda después de la **ablación**: 24 días (controles), **17** días (unilaterales) y **10** días (bilaterales). La mortalidad **fue** de **0%** en controles, **13%** en unilaterales y **33%** en bilaterales hasta la **toma** de muestra.

Abstract

The **eyestalk** ablation is the most common practice procedure to induce gonad maturation in commercial hatcheries of Penaeid shrimps. Besides reproduction, other physiological and metabolic processes could be affected by removal of the neuroendocrine gland. In the present study, we investigated the influence of **eyestalk** ablation on concentration of glucose, lactate, triglycerides, cholesterol and protein in plasma. In addition, total activity of cellular and plasma prophenoloxidase, plasma phenoloxidase and the number of hemocytes were also measured. We compared unablated (control), unilateral and bilateral ablated males and females in intermolt stage. Two-way ANOVA were used to analyze the data with treatment and sexes as factors, and then, two-mean comparison tests were executed. Significant interaction was detected in the concentration of glucose, this means a difference in the metabolism of glucose in males and females. Concentration of glucose is significantly higher in males unilaterally ablated with respect to bilaterals, and females had only a trend to lower concentration in organisms unilaterally and bilaterally ablated. Significant interaction was detected in the concentration of triglycerides. The interaction means a difference in the metabolism of triglycerides in males and females. Concentration of triglycerides in females unilaterally ablated was significantly lower with respect to control. Significant interaction was also detected in the concentration of protein, this means a difference in the metabolism of protein in males and females. Protein was lower in male unilaterally ablated, but higher in female unilaterally ablated with respect to their respective controls. **The** concentration of lactate in both sexes unilaterally ablated was significantly higher with respect to bilaterals. In addition, lactate showed significantly

higher concentration in female (treated and control) with respect to males. In the concentration of cholesterol and number of total haemocyte, significant differences were not observed. Total activity of cellular prophenoloxidase showed significantly higher activity in males (treated and control) with respect to females. **In** both sexes bilaterally ablated, total activity of plasma prophenoloxidase was significantly lower with respect to controls. Organisms unilaterally ablated, total activity of **phenoloxidase** was significantly higher with respect to bilaterals. A significant decrease in the molt period was observed: **24** days (control), **17** days (unilateral), and 10 days (bilateral). The mortality during the first molt cycle was **2%** (control), 33% (unilateral), and 68% (bilateral).

Capitulo I

Introducción	-----	2
Antecedentes	-----	4
Justificación	-----	15
Objetivo	-----	17

Introducción

La creciente demanda de **camarón** en los mercados **nacional** e internacionales a propiciado el **desarrollo** de la camaronicultura. Esta demanda ha hecho de la camaronicultura una actividad con buena rentabilidad en Mexico. En la producción de estos **crustáceos**, muchos productores de larvas de camarón dependían de **las** capturas de **hembras** parchadas en el mar para obtener nauplios en **los laboratorios**. Sin embargo esta práctica era dependiente de la capacidad de **ir al** mar abierto donde se encuentran **los** organismos reproductores y de la abundancia de **hembras** ya parchadas (Chang, **1992**).

Con la búsqueda del mejoramiento de la producción comercial de nauplios, se ha **empleado** la ablación del pedunculo ocular para acelerar la **reproducción** en **hembras** (Bray y Lawrence, **1992**; Fingerman, **1995**; Gendrop-Funes y Valenzuela-Espinoza, **1995**). La **práctica** de la ablación del tallo ocular ha proporcionado mayor éxito en el aceleramiento de la **reproducción** en comparación con **los** intentos de controlar el sistema hormonal con **factores** externos (Shin-Ichi *et al.*, **1988**). **Esto** es debido a que en la base del **lóbulo** ocular se produce y se **secreta** la **hormona** inhibidora de la vitelogenesis (VIH), la **cual actúa inhibiendo** la síntesis de **vitelo** y la endocitosis en la gonada (Beltz, **1988**).

Varios procesos fisiológicos y metabólicos **regulan** el ciclo de **vida** de **los crustáceos**, y estos procesos están bajo el control hormonal. El conocimiento del **funcionamiento** del sistema **endócrino** es importante para la **manipulación** de procesos que se requieren en **los** laboratorios de producción. La ablación del tallo ocular, y por consiguiente la **eliminación** de la **VIH**, acelera el proceso de maduración (Chang, **1992**). Sin embargo, **además** de actuar en **los** procesos reproductivos, la ablación unilateral y bilateral provoca otros efectos en el metabolismo de

crustaceos en general (**Beltz,1988**; Chang, 1992). Se acelera el ciclo de muda debido a la eliminacion de la hormona inhibidora de la muda (MIH) (**Lachaise et al., 1993**), las **fuentes de energia** y **los** elementos estructurales utilizados por **los** crustaceos **sufren** alteraciones (Rosas et **al., 1992**; Santos y Keller, **1993a**). Por ejemplo, despues de la ablacion se han observado **cambios** importantes en la concentracion de glucosa en hemolinfa, hepatopancreas y musculo en *Astacus leptodactylus* (Kallen et **al., 1988**) y *Penaeus notiales* (Rosas et **al., 1993**), en la concentracion de lactato (Rosas et **al., 1992**; Santos y Keller, **1993b**), de trigliceridos en hepatopancreas y en la gonada **femenina** de *Penaeus japonicus* (Shin-Ichi., et **al., 1988**) y *Crangon crangon* (Spaargaren y Haefher Jr, **1994**), asi **como** en las concentraciones de proteina en plasma, musculo y hepatopancreas de *Crangon crangon* (Chang y **O'Connor, 1988**; Spaargaren y Haefher Jr, **1994**).

Con la practica de la ablacion unilateral y bilateral se producen mortalidades en **los** laboratorios de produccion de nauplios de camaron. El uso de antibioticos ha permitido disminuir en **gran** medida esta mortalidad. Aunque no ha sido demostrado, se sugiere que el sistema de defensa del camaron **podría** verse afectado en **forma** negativa por la ablacion. No se sabe **si existe** una **relación** entre la ablacion y el sistema de defensa de este **crustáceo**. **Al igual** que en otros invertebrados, el sistema de la profenoloxidasa es una de las partes medulares de **los** mecanismos de defensa **humoral** en crustaceos. Este sistema **participa** en el reconocimiento y eliminacion de **cuerpos** que no son propios y es **también** un componente importante en el mantenimiento del **organismo libre** de infecciones (Johanson y Soderhal, 1989). Posibles alteraciones que repercuten en una mayor o **menor** produccion, **secreción** o **activación** del sistema de la profenoloxidasa despues de la ablacion, **pondrían** poner **al** camaron en un estado de **desequilibrio**.

En el presente trabajo se estudio el efecto de la ablacion en las concentraciones de glucosa, **lactato**, trigliceridos, colesterol y **proteína** total en plasma. **Además** se **midió** la **actividad** total de la profenoloxidasa plasmatica y celular, fenoloxidasa plasmatica y el numero de hemocitos **totales**.

Antecedentes

En 1943, **Panouse** observo por **primera** vez **que** la ablacion del pedunculo ocular acelera el desarrollo de la gonada en crustaceos. Los resultados no **han** sido iguales para todos los crustaceos. Sin embargo, la ablacion del pedunculo ocular se ha **empleado** con **éxito** desde 1970 en la **producción** de larvas en la **mayoría** de los Penaeidos (Bray y Lawrence, 1992; **Gendrop-Funes** y Valenzuela-Espinoza, 1995). Los resultados obtenidos con **respecto** a la maduracibn sexual con el **método** de la ablacion del pedunculo ocular, son significativsmente mejores que los obtenidos con la **manipulación** de **factores** fisicos como la temperatura, la luz y el **alimento** (**Shin-Ichi et al., 1988**). Estos **factores** externos **regulan** la **reproducción**, la muda y otros eventos **internos** a traves de la **modulación** de la sintesis y **secreción** de los agentes neuroendocrinos como la VIH y la MIH (Van-Herp, 1992). A pesar de que se **tienen** ventajas con el uso de la ablacion, su aplicacion presenta riesgos en **términos** de **supervivencia**. **Según** **Gendrop-Funes** y **Valenzuela-Espinoza (1995)**, el exito depende del estadio de muda en el cual se aplica la ablacion. **Cuando** se ablaciona se induce la maduracibn, pero se ha observado que si la ablacion se **realiza** durante la premuda o la posmuda se presentan **mortalidades** mas **frecuentes** que en intermuda.

El sistema **endócrino** de crustaceos esta compuesto por tejido neuroendocrino y glandular (Beltz, 1988; Keller y Sedlmeier, 1988). El complejo organo X **seno** de la **glándula**

(OXSG), es el principal centro neuroendocrino del camarón, y se ubica en la base de **cada lóbulo** ocular. En este complejo se producen y se almacenan hormonas que **están** involucradas en la **regulación** de varios procesos fisiológicos y metabólicos. Después de la **eliminación** del OXSG por la **ablación** del pedunculo ocular, se ha encontrado una **relación** entre **las** hormonas producidas en este centro neuroendocrino y el desarrollo de la gonada (Fingerman, 1995), la muda (Chang y O'Conor, 1988), la **nutrición** y balance **energético** (Rosas *et al.*, 1995), el metabolismo de **lípidos** (Shin-Ichi *et al.*, 1988), el metabolismo de **carbohidratos** con especial **atención** en la regulación de glucosa en la **hemolinfa** (Santos y Keller, 1993a,b), la proteína en plasma (Chan *et al.*, 1988), el balance hidromineral, **los** latidos del corazón, la **aclimatación** a la temperatura, la **regeneración** y **los** cambios en la **pigmentación** (Keller y Sedlmeier, 1988; Bray y Lawrence, 1992).

La vitelogenesis es principalmente controlada por la VIH (Van-Herp, 1992; Fingerman, 1995), la **cual** actúa en la **inhibición** de la síntesis de proteínas e **inhibe** también **los** receptores para la **vitelina** en **los** ovocitos (Chang, 1992). La **producción** y **secreción** de la VIH no es continua a través del **año**, en la parte temprana del desarrollo gonádico la actividad de la VIH está ausente y después de la temporada de desove su actividad **comienza** a elevarse (Beltz, 1988; Chang, 1992). En *Litopenaeus vannamei*, la VIH **inhibe** *in situ* la síntesis de **vitelogenina** en el ovario (Aguilar *et al.*, 1992). Por otro **lado** se ha observado la **participación** de un factor neurohormonal que estimula la vitelogenesis, este factor se produce en el **cerebro** y en el ganglio **torácico** (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Fingerman, 1995). Otros experimentos han evidenciado que la presencia de la hormona de la muda (20-hidroxiecdisona) **también** es necesaria para la síntesis de vitelo (Charniaux-Cotton y Payan, 1988; Van-herp, 1992). Chang (1992)

menciona que los ecdisteroides están involucrados en el **desarrollo** del huevo y del embrión en algunas especies, sin embargo, en otras sucede diferente.

En **organismos** adultos, la síntesis y deposición de vitelo se **lleva a cabo** en los ovocitos durante la vitelogenénesis (Chang y O'Connor, 1983). El vitelo se compone principalmente de la lipoproteína llamada vitelina. En *Penaeus semisulcatus* (Browdy et al., 1990), *Orconectes limosus* (Van-Herp, 1992), *Procambarus bouvieri* (Aguilar et al., 1992) y *Crangon crangon* (Fingerman, 1995) se han observado dos **fuentes** de vitelina: la **primera** producida en el **retículo** endoplasmático de **las** células foliculares, y la segunda, la vitelina encontrada en la hemolinfa y que es sintetizada en el **hepatopáncreas** (Browdy *et al.*, 1990) y en el tejido adiposo **subepitelial** (Vafopoulou y Steel, 1995). Esta vitelina es **obtenida** por pinocitosis en los ovocitos. Utilizando anticuerpos ha sido posible detectar vitelina en el **hepatopáncreas**. Van-Herp (1992) menciona que los sitios de síntesis de vitelina en crustáceos ha sido un tema de discusión, en particular en los estudios con camarones de agua dulce y langostas, donde se concluye que la proteína **extraovárica** es una **cantidad** muy **pequeña** en el proceso de **formación** del huevo.

La gonada madura presenta hasta 10 veces mayor **cantidad** de lípidos con **respecto a las gónadas** inmaduras. Los acilglicéridos son la **familia más** abundante de lípidos y **están** formados por una **molécula** de glicerol y una, dos o tres moléculas de ácidos grasos. Los **triglicéridos**, son los más abundantes y representan **fundamentalmente** una **reserva energética** importante, aunque sus ácidos grasos pueden ser **utilizados** para otros fines (Lehninger, 1980; Shin-Ichi et al., 1988). Shin-Ichi et al., (1988) y Santos y Kaller (1993a) mencionan que el incremento de lípidos en la **gónada** proviene del uso de las reservas más que por un incremento en la obtención **directa** de la dieta. Los triglicéridos y en general los lípidos antes de ser

transportados a la gonada son almacenados en el hepatopancreas (Chang y O'Connor, 1983). En los huevos de crustaceos, los lipidos son importantes como un recurso de energia y constituyentes celulares en la embriogenesis y desarrollo temprano de la larva (Shin-Ichi et al., 1988).

La muda se lleva a cabo por la acción de una hormona esteroide llamada 20-hidroxicdisterona (Chang, 1985; Chang y O'Connor, 1988; Wilder y Aida, 1995). Esta hormona es producida en el organo Y (OY) situado en la cámara branquial de los crustaceos (Chang y O'Connor, 1988; Chang, 1992). Esta hormona se encuentra bajo el control de la MIH producida en el OXSG. Cuando se elimina esta hormona ocurre una sintesis y secreción continua de 20-hidroxicdisterona por el OY, y cuando se inyecta extracto de OXSG la sintesis y secreción se inhiben totalmente (Chang, 1985; Lachaise et al., 1993). Chang (1989) presenta una recopilacion de especies de crustaceos en los cuales se ha observado el efecto inhibitor de la MIH sobre la 20-hidroxicdisterona y la muda.

La MIH actua regulando el ciclo de muda a traves de la inhibicion de la sintesis de 20-hidroxicdisterona y de proteinas, y tambien actúa en la inhibicion de la captacion de colesterol, el cual es el precursor para la sintesis de ecdisterona (Chang, 1989). Con la ablación disminuye la MIH, se sintetiza 20-hidroxicdisterona en el OY y aumenta la producción de proteina, disparando asi la premuda y con ello una serie de cambios fisiologicos y metabolicos que preparan al organismo para desprenderse del exoesqueleto, expanderse con la absorcion de agua y endurecer su nuevo exoesqueleto (Chang, 1992). Chan et al. (1988) caracterizaron los estadios de muda en *P. vannamei*, y reportan que la premuda e intermuda duran 53% y 40% respectivamente del tiempo total del ciclo de muda.

transportados a la gonada son almacenados en el hepatopancreas (Chang y O'Connor, 1983). En **los** huevos de crustaceos, **los** lipidos son importantes **como** un **recurso** de energia y constituyentes celulares en la embriogenesis y desarrollo temprano de la larva (Shin-Ichi et al., 1988).

La muda se lleva a **cabo** por la **acción** de una hormona esteroide llamada **20-hidroxiecdisterona** (Chang, 1985; Chang y O'Connor, 1988; Wilder y **Aida**, 1995). Esta hormona es producida en el organo Y (OY) situado en la **cámara** branquial de **los** crustaceos (Chang y O'Connor, 1988; Chang, 1992). Esta hormona se encuentra bajo el control de la MJH producida en el OXSG. Cuando se elimina esta hormona ocurre una sintesis y secrecion continua de **20-hidroxiecdisterona** por el OY, y cuando se inyecta extracto de OXSG la sintesis y secrecion se inhiben totalmente (Chang, 1985; **Lachaise** et al., 1993). Chang (1989) presenta una recopilacion de especies de crustaceos en **los** cuales se ha observado el efecto inhibitor de la MJH **sobre** la **20-hidroxiecdisterona** y la muda.

La MIH actua regulando el ciclo de muda a traves de la inhibicion de la sintesis de **20-hidroxiecdisterona** y de proteinas, y tambien actua en la **inhibición** de la captacion de colesterol, el cual es el precursor para la sintesis de ecdisterona (Chang, 1989). Con la **ablación** disminuye la MIH, se sintetiza **20-hidroxiecdisterona** en el OY y aumenta la **producción** de proteina, disparando asi la premuda y con **ello** una serie de cambios fisiologicos y metabolicos que preparan **al organismo** para desprenderse del exoesqueleto, expanderse con la absorcion de agua y endurecer su nuevo exoesqueleto (Chang, 1992). Chan et al. (1988) caracterizaron **los** estadios de muda en *P. vannamei*, y **reportan** que la premuda e intermuda duran 53% y 40% respectivamente del tiempo total del ciclo de muda.

La hormona hiperglucemiante de crustaceos (CHH) se sintetiza, se almacena y es secretada por el complejo OXSG. La CHH eleva la **concentración** de glucosa en la hemolinfa de crustaceos a **través** de la estimulación de la glucogenólisis en hepatopancreas y músculo (Sedlmeier, 1985), la **inhibición** de la síntesis de glucógeno (Chang y O'Connor, 1983; Sefiani et al., 1996). **Además** participa en la **secreción** de **enzimas digestivas** (Keller y Sedlmeier, 1988; Liischen et al., 1993;) y **promueve también** la glucólisis (Santos y Keller 1993a). Keller y Sedlmeier (1988) **reportan** que en *C. maenas* el nivel basal de CHH se encuentra entre 0.3×10^{-10} M y 1×10^{-9} M. Sin embargo, bajo condiciones de **estrés reportan** concentraciones de 1.5×10^{-9} M o más altas. Los mismos autores **reportan** que existe CHH **fuera** del complejo OXSG, principalmente en el brgano **pericardial**.

La energía **libre** para **realizar** el trabajo mecánico en la **contracción** muscular, síntesis de biomoléculas y transporte **activo** de iones y moléculas, se almacena en el ATP antes de **su utilización**. Esta energía es obtenida a partir de moléculas tales **como** la glucosa, **los aminoácidos** y **los ácidos grasos** (Lehninger, 1980; Stryer, 1988). En general la glucosa es la principal fuente para producir energía en **forma** inmediata en el metabolismo de **los organismos** (Chang y O'Connor, 1983). Para la producción de energía, la glucosa es oxidada a piruvato en la glucólisis, y a partir del piruvato se **tienen** dos vías: 1) en condiciones aerobias, el piruvato entra en el ciclo de **los ácidos** tricarboxílicos donde se recolecta la mayor parte de energía y se produce ATP y CO_2 . 2) en condiciones de anaerobiosis, el piruvato entra en la vía del ácido **láctico** donde se producen ATP y **lactato**. La vía del ácido **láctico** es la ruta principal del catabolismo en el músculo de crustaceos (Chang, 1992; Santos y Keller, 1993a).

Chang y O'Connor (1983) observaron que la vía de metabolización de la glucosa cambia con el ciclo de muda. Durante la intermuda, la glucosa es metabolizada por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y durante la premuda, se reduce la **actividad** del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la glucosa es **también** metabolizada por la vía del ácido láctico. Chan *et al.* (1988) describieron los cambios en la **concentración** de glucosa plasmática durante un ciclo de muda en *P. vannamei*, encontrando que **las más** altas concentraciones de glucosa ocurren durante la intermuda y son **menores** en la premuda y posmuda. Telford (1975) **reporta** que en *Orconectes propinquus*, *O. immunis* y *O. virilis* no hay diferencias significativas entre los machos y las **hembras** en las concentraciones de glucosa durante el ciclo de muda. Se han **medido** las concentraciones de glucosa en plasma después de la ablación del pedúnculo ocular en diferentes especies. Los resultados muestran que en *Orconectes limosus* y *Chasmagnathus granulata* ocurre una hipoglucemia (Santos *et al.*, 1988; Sarojini *et al.*, 1995), se mantiene sin cambios en *C. maenas* (Ching-ming *et al.*, 1995) y en *Penaeus notiales* ocurre una hiperglucemia (Rosas *et al.*, 1993).

Otra hormona que se pierde con la ablación del tallo ocular es la hormona neurodepresora (NDH), la cual, en condiciones **normales** mantiene la **regulación** del ciclo **diurno**, deprimiendo el sistema motor y sensor del **organismo** (Fingerman, 1995; Rosas *et al.*, 1995; Huberman, 1996). En *Orconectes limosus* y *Cambarus* sp. la ablación induce hiperactividad debido a la falta de NDH (Huberman, 1996). Fingerman (1995) menciona que no se tiene la caracterización completa de la NDH. Sin embargo, el efecto neurodepresor parece **ocurrir** en todos los crustáceos. Así, la NDH aislada de *Cambarus robustus* es activa en *Procambarus bouvieri* (Huberman, 1996).

Con la **eliminación** de la NDH se eleva la actividad motora de **los** organismos, con esto aumenta el metabolismo de la glucosa por la vía del ácido láctico, y **como** consecuencia aumenta la concentración de lactato en la hemolinfa. El lactato **permite** mantener la regeneración de NAD⁺ en la **reducción** de piruvato, impidiendo que se detenga la **glucólisis** (Stryer, 1988). En crustáceos, la energía para la actividad muscular es obtenida principalmente por esta vía, por lo que es común encontrar concentraciones altas de lactato en camarones bajo condiciones **normales** (Rosas et *al.*, 1993; Santos y Keller, 1993a). Por otro **lado**, el lactato **regula** la secreción de **CHH** por retroalimentación positiva en *C. maenas* (Webster, 1996), y **altas** concentraciones de glucosa **inhiben** la secreción de **CHH** (Keller y Sedlmeier, 1988).

En general, tras la **ablación** se reporta un aumento en la síntesis de proteína (Chang, 1989). Aumenta la hemocianina en *Peleomon adspersus* (Hagerman y Webster, 1981 y), las lipoproteínas en *Penaeus semisulcatus* (Browdy et *al.*, 1990), en *Orconectes limosus* (Van-Herp 1992) y en *Oniscus asellus* (Vapoulou y Steel, 1995), las **enzimas** que **catalizan** reacciones químicas (Lehninger, 1980) y en general, todas estas participan en la **conservación** de la presión osmótica y son una reserva para la regeneración y crecimiento de tejidos (Chang y O'Connor, 1983). Con la ablación **ocurre** un **incremento** en el **consumo** de **O₂** en **las hembras** (Rosas et *al.*, 1992) principalmente por un aumento en la actividad muscular y del **hepatopáncreas** (Chang y O'Connor, 1983; Rosas et *al.*, 1993). El aumento en la **demand**a de **O₂** produce un aumento en la concentración de hemocianina en el plasma (Van-Aardt y Wolmarans, 1987).

En crustáceos durante la fase de intermuda, la hemocianina representa hasta el 95% del total de **las** proteínas en el plasma. Chan et *al.* (1988) observaron **los** cambios en la **concentración** de proteína en el plasma de *L. vannamei* durante un ciclo de muda. Las **menores**

concentraciones de proteína se observaron durante la posmuda y la mayor **concentración** ocurre en la premuda. Es también en la premuda donde se observa un aumento en la **cantidad** de enzimas que se sintetizan para **lisar la quitina** de la **piel**, y **compuestos proteicos** que se almacenan en el plasma y el **tracto digestivo** (Chang, 1985; Lachaise *et al.*, 1993).

Los crustáceos son incapaces de sintetizar **colesterol**, este compuesto debe ser obtenido directamente del **alimento** (Shin-Ichi *et al.*, 1988). Dall y Moriarty (1983) **reportan** que se requiere por lo **menos** un 0.5 % de colesterol en la dieta para obtener buenos resultados en el **crecimiento**. El colesterol en crustáceos es utilizado principalmente en el epitelio del tracto **digestivo** cumpliendo **funciones** de permeabilidad, también **recubre los axones nerviosos** y es el precursor de las hormonas esteroideas producidas en el OY (Chang y O'Connor, 1988; Muramoto, 1988). También este compuesto se almacena en **los** huevos de camarones Penaeidos y es importante en **su** desarrollo (Shin-Ichi *et al.*, 1988).

Al igual que otros invertebrados, el camarón posee un sistema inmunológico que le **permite** mantener **su** integridad **biológica**. En vertebrados, este sistema que distingue lo que es propio y lo que es extraño (Warr, 1981; Johansson y Söderhäll, 1989), no es un sistema **autónomo**. Este sistema está conectado **al** sistema nervioso y **al** sistema **endócrino** constituyendo un multisistema (Jankovic, 1994; Panerai, 1994). En invertebrados no se conocen las relaciones **funcionales** entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune.

El sistema **inmunológico** de crustáceos se compone de elementos celulares y humorales. Ashida y Söderhäll (1984) y Smith y Söderhäll (1991) describieron dos poblaciones morfológicamente diferenciables en **los elementos** celulares de la **hemolinfa** de crustáceos: hemocitos hialinos y hemocitos **granulares**, estos últimos se dividen en **semigranulares**, con

gránulos pequeños (0.4 μm) y granulares, con **gránulos grandes** (0.8 μm) (Vargas-Albores, 1995). Los hemocitos hialinos son típicamente fagocíticos y participan en la **coagulación**. Los hemocitos semigranulares son **los** más sensibles ante la presencia de material no propio (Johanson y Söderhäll, 1989), estos son **los** únicos que **comienzan** la **encapsulación**, aparentemente en forma no específica y también **tienen** capacidad fagocítica (Söderhäll et al., 1986; Johanson y Söderhäll, 1989). Los hemocitos granulares apoyan la **encapsulación** y la **formación** de **nódulos** (Söderhäll et al., 1986). Moullac et al. (1997) describieron las variaciones en el número de hemocitos, durante un ciclo de muda en *Penaeus stylirostris*. Ellos encontraron un número de hemocitos significativamente mayor durante la **etapa** de intermuda con **respecto** a la premuda y posmuda.

En **crustáceos**, la defensa del hospedero contra microorganismos invasores, se inicia con un sistema de fagocitosis no inducible. Como resultado de esta fagocitosis se estimulan **los** hemocitos **aledaños** y se activan elementos del sistema de defensa **humoral**. El sistema **humoral** se compone de moléculas (Lanz et al., 1993). Entre las **moléculas más** importantes, se encuentran **las** enzimas del sistema profenoloxidasas (**pFO**) (Söderhäll y Smith, 1986; Soderhall et al., 1986; Lanz et al., 1993). La exocitosis del sistema **pFO** se produce en presencia de componentes de la pared celular de microorganismos **como lipopolisacáridos** (LPS) de bacterias gram negativas, peptidoglucanos (PG) de bacterias gram positivas y R-glucanos (RG) de hongos (Ashida, 1990; Aspán et al., 1990; Vargas-Albores, 1995). En artrópodos se ha encontrado que **existen** moléculas proteicas que reconocen estos componentes de la pared celular de microorganismos. Hasta la fecha se han descrito las proteínas de **unión** a LPS (LPSBP) en **los camarones** *P. californiensis* (Vargas-Albores et al., 1993) y *Pacifastacus leniusculus* (Kopacek et al., 1993), a PG (PGBP) en el **insecto** *Bombyx mori* (Ashida, 1990) y a **β G** (**β GBP**) en *Pacifastacus*

leniusculus (Johanson y Söderhäll, 1989). Estas **moléculas de unión**, presentan dos **sitios** de unión a compuesto diferentes, mientras uno reconoce componentes de la pared celular de los microorganismos, el otro reconoce receptores de membrana en hemocitos fagocíticos (Olafsen, 1988). En su **acción** las células fagocíticas se **lisan** y **secretan pFO**, esto estimula la **secreción** del sistema **pFO** de los hemocitos granulares y semigranulares **aledaños** (Söderhäll et al., 1986; Lanz et al., 1993; Vargas-Albores et al., 1993).

En diferentes especies, *P. californiensis* (Vargas-Albores, 1995), *Astacus astacus* y *Pasifastacus leniusculus* (Smith y Söderhäll, 1983; Johanson y Söderhäll, 1989; Aspán et al., 1990), el sistema **pFO** se caracteriza por la presencia de la **proenzima pFO** dentro de los **gránulos** de los hemocitos granulares y semigranulares, a diferencia de lo que **ocurre** en algunos insectos como *Bombyx mori* donde el sistema se encuentra en el plasma (Soderhall et al., 1986).

En crustáceos, la **pFO** en la hemolinfa, es convertida a su **forma** activa (FO) por la **enzima** activadora de la **pFO** activada (EApFO) (Johansson y Soderhall, 1989; Lanz et al., 1993). Esta EApFO se encuentra también en **forma** inactiva (**pEApFO**) en el interior de los **gránulos**. Johansson y Söderhäll (1989) mencionan que la activación de la **pEApFO** es apoyada por LPSBP, β GBP y PGBP activadas. Ashida y Söderhäll (1984) observaron que en *Astacus astacus* el Ca^{++} está involucrado en esta activación y Gollas-Galván et al. (1997) demostraron que en el camarón café *P. californiensis* el Ca^{++} es necesario para la activación de la **pEApFO**.

Una vez convertida la **pFO** en FO en el plasma, se aumenta el efecto del reconocimiento y la **actividad** celular se intensifica (Soderhall y Smith, 1984; Söderhäll et al., 1986; Johanson y Söderhäll, 1989), se acelera la fagocitosis (Smith y Söderhäll, 1983), se induce la **formación** de **nódulos** y capsulas (Söderhäll et al., 1984), se producen sustancias **fungistáticas** a

traves del proceso de melanizacion (Johanson y **Söderhäll**, 1989; **Vargas-Albores**, 1995) y se **incrementa** la aglutinacion de **los cuerpos extraños** (**Ratcliffe** et al., 1982; Johanson y **Söderhäll**, 1989). Moullac et al. (1997) midieron la actividad de la FO en hemocitos de *P. stylirostris* a traves de un ciclo de muda, ellos **observaron** que la mayor actividad de la FO con **respecto al** numero de hemocitos **ocurre** en la intermuda y es **menor durante** la premuda y posmuda.

Una ves activado el sistema **pFO**, la **eliminación** del patogeno es dependiente del tiempo. Sin embargo cuando el patogeno ha sido destruido, el sistema **pFO** debe **ser** detenido. El **modelo** mas estudiado para tratar de explicar el control del sistema **pFO** es la **inhibición** de la **pEApFO** mediada por proteolisis. **Aspán** et al. (1990) **describieron** el efecto de proteinasas endogenas inhibidoras del sistema de la **pFO** en *Pacifastacus leniusculus*. Estas proteasas son **un** inhibidor de **enzimas** tipo tripsina **de** 155 **kDa** y una **α -macroglobulina** de 190 **kDa**. Las dos moleculas inhiben la proteasa activadora de la **pFO**.

Justificación

La creciente demanda de **camarón** en el **mundo** ha fomentado la **creación** de **centros** de producción de estos crustáceos. En **México** el **cultivo** de *Penaeus* vannamei ha **tenido** un desarrollo importante (**Vargas-Albores**, 1995). Como parte de este desarrollo, se han realizado una serie de experimentos dirigidos a **entender** su biología reproductiva para **definir mejores** condiciones en el cultivo. Debido a las fluctuaciones y disminución en las capturas de productos comerciales en **todo** el mundo, la importancia de las **técnicas** aplicadas en acuicultura se han incrementado (Chang, 1992). Sin embargo, no ha sido posible lograr producciones continuas porque **existen** problemas en **los** laboratorios de producción de larvas que **tienen** que ver con enfermedades de origen microbiano.

Uno de **los** principales objetivos en el cultivo de camarón es la producción de larvas. En este campo, ha **tomado** especial interés la posibilidad de obtener la mayor **cantidad** de larvas en el **menor** tiempo. Por esta **razón** se **han** buscado estrategias para lograr que las **hembras** maduren rápidamente. **La** estrategia utilizada con mayor **éxito** es la ablación del tallo ocular, la **cual** es utilizada en la **mayoría** de **los** laboratorios de **producción** de larvas de *Penaeus* vannamei (Bray y Lawrence, 1992; Gendrop-Funes y **Valenzuela-Espinoza**, 1995). Sin embargo, **además** del proceso de maduración en la gonada, se sabe de una **serie** de cambios fisiológicos y metabólicos que son estimulados por la ablación, entre otros se ha observado una disminución en el **periodo** del ciclo de muda (Santos y Keller, 1993b), una alteración en el metabolismo **energético** (Rosas et al., 1993), una **hiperactividad** (Bray y Lawrence, 1992) y una alteración en el metabolismo de lípidos (Shin-Ichi et al., 1988).

El sistema **pFO**, el **cual** tiene como principal **función** la **prevención** de **enfermedades** en el camarón, juega un **papel** importante en el éxito de la producción (Johanson y **Söderhäll**, **1989**). **Al momento** no se conoce la **relación** que existe entre el sistema neuroendocrino complejo OXSG y el sistema inmune en camarón. Se tiene ya una metodología para la **medición** de la enzima **pFO** (Lanz et al., **1993**; **Hernández-López**, **1996**). **Al momento**, la FO ha sido medida a través del ciclo de muda (Moullac et al., **1997**). La influencia de la **ablación sobre éste** sistema no ha sido evaluada como en otros componentes del metabolismo, por lo que en este trabajo se estudia la influencia de la ablación del pedunculo ocular, **sobre la actividad** total de las **enzimas** del sistema **pFO**. **Además**, se pretende **aportar** más **información sobre** el metabolismo **al analizar** el efecto de la ablación unilateral y bilateral en las concentraciones de glucosa, el **lactato**, el colesterol, **los** triglicéridos, y la proteína total en el plasma del camarón. Lo anterior **permitirá** conocer las consecuencias de la ablación del tallo ocular en algunos aspectos del metabolismo y **sobre** el sistema inmunológico en el camarón blanco *L.vannamei*. Las posibles alteraciones en el metabolismo y en el sistema profenoloxidasa, **debidas** a la ablación del pedunculo ocular, requieren de estudios que expliquen **los** procesos de **regulación** con fines de encontrar **formas** para una mejor **manipulación** en **los** sistemas de producción.

Objetivo

Analizar el efecto de la ablacion del tallo ocular **sobre algunas** variables metabolicas y el sistema profenoloxidasa del **camarón** blanco *Penaeus vannamei*.

Objetivos Particulares.

1. Analizar en ambos sexos, la influencia de la ablacion unilateral y bilateral **sobre** las concentraciones de proteina plasmatica, colesterol, trigliceridos, glucosa y **lactato**.

2. Analizar en ambos sexos, la influencia de la ablacion unilateral y bilateral del tallo ocular **sobre** la actividad total de la profenoloxidasa celular y plasmatica, fenoloxidasa plasmatica y el numero de hemocitos **totales**.

Capítulo II

Material y método	-----	19
Animales , traslado y mantenimiento	-----	19
Marcado y reconocimiento	-----	19
Ablación del pedúnculo ocular	-----	20
Obtención de hemolinfa	-----	20
Contéo y separación de hemocitos	-----	22
Medición de profenoloxidas y fenoloxidasa	-----	22
Medición de metabolitos	-----	23
Análisis estadístico	-----	25

Materiales y método

ANIMALES: TRASLADO Y MANTENIMIENTO

Cien camarones (*Litopenaeus vannamei*) de la misma cohorte con un promedio de 14 g **fueron obtenidos** de los estanques de marea del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Los camarones **fueron** transportados a 23 °C en 2 **hieleras** de 40 litros a la Unidad **Piloto** de **Maricultura** (UPIMA) ubicada en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR). Los camarones **fueron** colocados en tanques circulares con fondo plano de 1.5 m de **diámetro** por 80 cm de **profundidad**. El sistema de cultivo **utilizado fue** un sistema cerrado que proporciono un **recambio** de **más** de 400 % cada 24 h. La temperatura se **controló** a 23.5 ± 1 °C. Los camarones se alimentaron con peletizado de PIASA (Proteína **40%**, **mínimo** de grasas 7 %, **máximo** de fibras 3 %, **maxima humedad** 12 %, **máximo** de cenizas 11 %) en raciones del 5 % en **relación** a **su** biomasa por las **mañanas** y con **calamar fresco** en un 20 % de la biomasa por las noches. El fondo de cada tanque se **aspiró** diariamente por las **mañanas** para retirar el **alimento** no consumido y el material **sólido** de desecho. Se mantuvieron en condiciones naturales de fotoperiodo. La mortalidad **fue** registrada en cada uno de **los grupos**.

MARCADO Y RECONOCIMIENTO DE LOS ORGANISMOS

Para conocer el estadio de muda, **los animales** se mantuvieron en **los** tanques de cultivo durante un ciclo de muda **previo** al **tratamiento**, permitiendo **así** la aclimatacion de **los** organismos. En este **periodo** se **realizó** el **marcado** de **los** organismos mediante **cortes** en **los** cuatro uropodos. Con este marcaje, se identificaron 16 organismos por tanque, la marca

permaneció **tanto** en la muda como en el organismo, lo que **permitió** seguir el ciclo de muda **completo** de cada organismo y establecer el estado de intennuda.

ABLACIÓN DEL PEDUNCULO OCULAR

Dos días después de la muda se efectuó la ablación. Se **realizó** un tratamiento de ablación del pedunculo ocular con tres niveles: ablación unilateral (ojo izquierdo), bilateral (**los** dos ojos) y **los** organismos controles (sin ablación). Se **ablacionó** bilateralmente el doble de organismos **tomando** en cuenta la mortalidad esperada. La **ablación** se **realizó** dentro del agua por **corte** con tijeras en la base del tallo, después se mantuvo la presión con **los** dedos durante 10 segundos en la base del tallo para evitar desangrado y facilitar la **coagulación**. Los organismos se mantuvieron en las condiciones ya descritas.

OBTENCIÓN DE HEMOLINFA

La **toma** de hemolinfa se realizó 5 días después de la ablación, en el **periodo** de intermuda. La muestra se **tomó** en **ayunas** entre las 8:00 y 9:00 a.m. para evitar diferencias **debidas al** ciclo circadiano (Kallen *et al.*, 1990). La hemolinfa **fue extraída** con jeringas para insulina (27G x 13 mm) de la parte ventral que comprende el primer **segmento** de **los** pleopodos, ligeramente anterior **al** poro genital. La jeringa se cargó con una **solución** isotónica para **camarón** y EDTA como anticoagulante (SIC- EDTA, Na) (**NaCl 450 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM + EDTA, Na₂ 10 mM pH 7.3, 850 mOsm/kg**) previamente **enfriado** a 4 °C (Vargas-Albores *et al.*, 1993) en una **proporción 2:1** (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen **extraído** de hemolinfa). La secuencia para las mediciones se muestra en la figura 1.

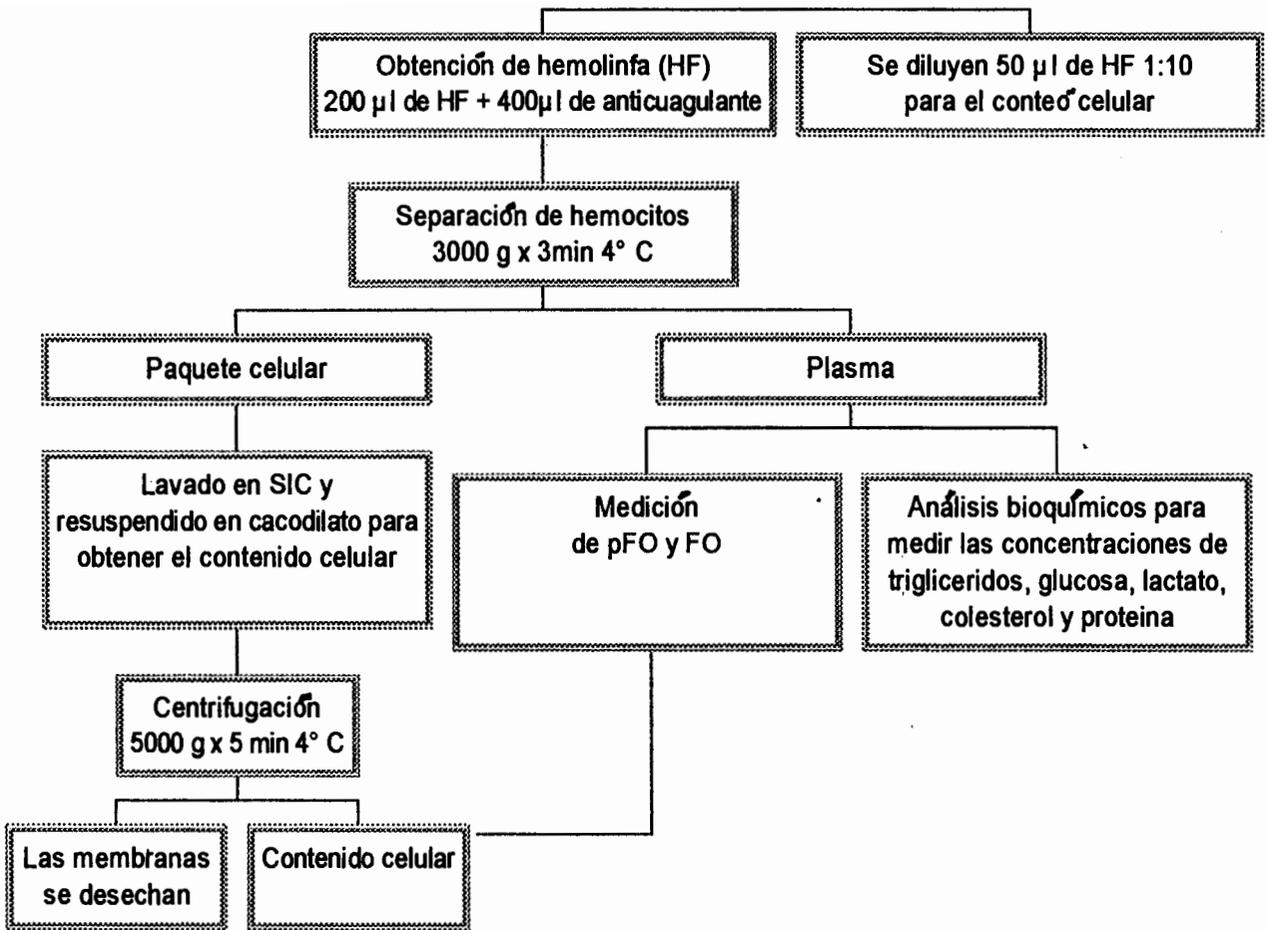


Fig 1. Secuencia llevada al cabo para procesar las muestras de hemolinfa.

CONTEO Y SEPARACIÓN DE HEMOCITOS

El conteo de hemocitos se realizo por medio de una camara de Neubauer con una reticula de 0.01 mm. Se **tomaron** 50 μl de hemolinfa y se diluyeron 1:10 en SIC. A partir de esta **dilución** se **realizaron** 2 conteos en el microscopio. Para separar **los** hemocitos del plasma, se **centrifugó** a 3000 g por 3 min. Se separo el plasma del paquete celular. Las celulas se lavaron con 1 **ml** de SIC y se **centrifugó** a 3000 g por 3 **min**. Se adicionaron 500 μl de cacodilato de sodio 10 mM a pH 7 y se **centrifugó** a 5000 g por 5 min para romper las celulas y obtener el contenido celular. El contenido celular y el plasma se mantuvieron en **hielo** para **los análisis** de **pFO** y FO. Para la **medición** de metabolitos, el plasma se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mas de 10 dias.

MEDICIÓN DE FENOLOXIDASA Y PROFENOLOXIDASA.

La **medición** de la actividad total de la **pFO** y la FO se **realizó** con la tecnica descrita por Hernandez-Lopez *et al.* (1996). La actividad de la FO presente en el plasma se **midió** espectrofotometricamente por la **formación** de dopacromo a partir de L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) de acuerdo con Leonard *et al.* (1985). A 50 μl de muestra, se le adicionaron 50 μl de cacodilato buffer 10 mM a pH 7 y 50 μl de L-Dopa (3 **mg/ml** en agua destilada). Se **incubó** durante 10 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, despues se adicionaron 800 μl de cacodilato buffer y se leyó la absorbancia a 492 nm. En todos **los** ensayos se **utilizó** cacodilato como control negativo. La **pFO** se determino activando previarnente con tripsina (0.1 **mg/ml** en agua destilada) para convertirla en FO. La actividad de la FO activada se midió como se describio previamente. La actividad total esta expresada como el **cambio** en la absorbancia a 492 nm x **min** x **ml** de hemolinfa obtenida.

La **cantidad** de **pFO** disponible en la muestra se calculo de la siguiente **forma**:

$$\text{FO} + \text{FO activada con tripsina} = \text{FO total}$$

$$\text{FO total} - \text{FO} = \text{pFO}$$

MEDICIÓN DE METABOLITOS

Las concentraciones de metabolitos se midieron utilizando **Kits enzimáticos** comerciales de Merk y Sigma, y una **adaptación** para microplaca descrita por Jorge **Soto** (Tesis de licenciatura en proceso). La tabla 1 muestra el **método** para la **medición**

Tabla 1. **Método empleado** para medir los metabolitos en microplaca

	Trigliceridos	Colesterol	Glucosa	Lactato	Proteina
Muestra (pl)	10	20	10	50	10
Reactivo (pl)	200	200	200	200	200
T (°C)	24	24	24	24	24
Incubación (min)	10	10	30	10	10
Absorbancia (nm)	492	492	492	560	560

El kit utilizado para medir trigliceridos, lisa por medio de **lipasas** hasta glicerol y acidos grasos. El glicerol + ATP y glicerocinasa **forma** L-a-glicerol-3-fosfato + ADP
L-a-glicerol-3-fosfato + O₂ y glicerol-3-fosfato oxidasa, **forma** Dihidroxiacetonafofato + H₂O₂
H₂O₂ + 2-Clorofenol + 4-aminoantipirina, **forma** 4-(o-benzoquinonamonoimina) fanezona + 2H₂O + HCL.

La intensidad del color desarrollado a 492 nm, es directamente **proporcional** a la **concentración** de trigliceridos en la muestra.

El kit para medir el colesterol, separa el colesterol y sus esteres de las lipoproteinas por medio de detergentes. La colesterol-esterasa hidroliza **los** esteres. En presencia de colesterol-oxidasa hay una **oxidación enzimática** en la cual se **forma** H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona con el **4-aminoantipirina** y **fenol** en presencia de una peroxidasa para **formar** una quinoneimia coloreada que se **detecta** a 492 nm.

El kit para medir la glucosa, oxida la glucosa con la glucosa-oxidasa liberando H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona con el 4-aminoantipirina y **fenol** en presencia de una peroxidasa para **formar** una quinoneimia coloreada que se detecta a 492 nm.

El kit para medir **ácido láctico**, **convierte** el ac. **láctico** en **piruvato** y H_2O_2 **por la acción** de la **lactato-oxidasa**. En presencia de una peroxidasa hay una condensacion de un precursor **cromógeno** y se produce color. La intensidad del color medida a **560nm** **es directamente proporcional** a la concentracion del ac. **láctico** en la muestra.

Para proteina total se utilizo la **técnica** de Bradford (1976), la **cual** se basa en la union del colorante comassie **azul** brillante G-250 a las proteinas, el **cual** se **mide** espectrofotometricamente a 560 nm. El plasma se diluyo **1:500** en SIC para obtener una **concentración** dentro del **intervalo** de sensibilidad del **método**. Se utilizo albumina bovina **como** estandar. Las **técnicas** **fueron** estandarizadas para una concentracion de sal de **450 mM** y un lector para microplaca tipo ELISA (Labsystem Uniskan) (Jorge **Soto**, tesis en proceso).

Todas las mediciones se realizaron utilizando una **solución** patron, de tal **forma** que

$$[\text{concentracion problema}] = \text{Abs. muestra} \times \frac{[\text{concentracion patron}]}{\text{Abs. patrón}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se **realizó** un **análisis** de normalidad y de homogeneidad de la varianza a **cada** una de las variables. Debido a que **los** datos no presentan una **distribución** normal las concentraciones de lactato **fueron** comparadas por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Steel y Tome, 1997). Se aplicó **una** **análisis** de varianza bifactorial a todas las demás variables con el tratamiento y **sexo** **como** factores. Se utilizó la prueba **Pos-hoc** de Tukey para comparar medias y detectar las diferencias significativas en el ciclo de muda, las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol, número de hemocitos, **pFO** y FO. Debido a que la prueba de Tukey no encontró las diferencias significativas en las concentraciones de **proteína** se **utilizó** la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) (Steel y **Torrie**, 1997).. Para realizar **los** análisis, se **utilizó** el paquete **Statistica** Version 4.5. **StatSoft** Inc, 1993 con un $\alpha=0.05$,

Capítulo III



Resultados

En el transcurso del experimento se presentaron mortalidades en dos periodos. El primero ocurrió en las primeras 4 horas después de la ablación, y el segundo periodo de mortalidad ocurrió durante el proceso de muda siguiente a la ablación (tabla 2). El porcentaje de mortalidad es mayor en los organismos ablacionados bilateralmente, de igual forma, el porcentaje de muertos es mayor en las hembras con respecto a los machos.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad ocurrida en cada uno de los grupos tratados por sexo, (A) durante el periodo de ablación y (B) durante el proceso de muda siguiente a la ablación. Se presenta el promedio de mortalidad en ambos sexos por periodo y el promedio acumulado. M= Machos H= Hembras

	No. de organismos		A (%)			B (%)			Promedio acumulado
	M	H	M	H	Promedio	M	H	Promedio	
Unilaterales	17	13	12	15	13	26	18	22	35
Bilaterales	18	18	16	50	33	26	44	35	68
Controles	12	8	0	0	0	5	0	2	2

El marcado de los organismos se logró con éxito, las marcas permanecieron durante uno o dos ciclos de muda hasta que hubo una regeneración completa de los urópodos, lo cual nos permitió detectar el periodo de intermuda y observar en forma individual la duración del ciclo de muda en relación con el tratamiento.

El ciclo de muda fue afectado significativamente ($P \ll 0.001$) por el tratamiento. El análisis de medias globales (machos y hembras) mostró que los organismos ablacionados bilateralmente tienen un ciclo significativamente más corto que los unilaterales y que los controles.

Los organismos ablacionados unilateralmente presentan un tiempo intermedio entre controles y bilaterales y es significativamente diferente de cada una de ellos. No se detectaron diferencias significativas entre los sexos. (fig. 2).

ANOVA

Muda	F	P
Tratamiento	34.1167	<<0.001
Sexo	0.2507	NS
Interacción	0.8127	NS

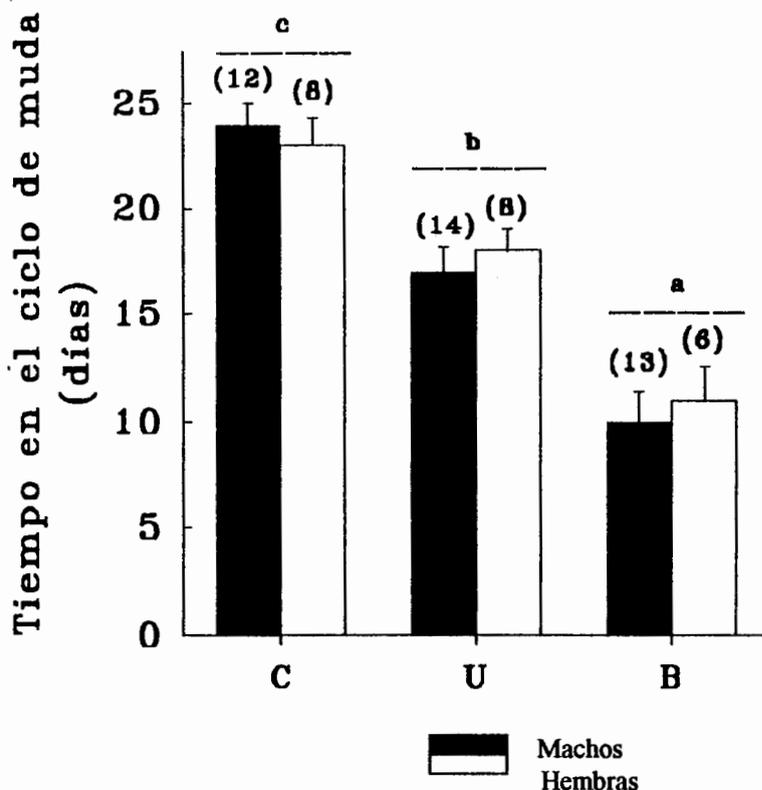


Fig. 2. Duración del ciclo de muda en el camarón blanco *L. vannamei*. (U) ablacionados unilateralmente, (B) bilateralmente y (C) controles. Se indica el valor promedio, la desviación estandar y el número de organismos (). Las letras sobre las barras, cuando no son similares indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Se detectó una interacción significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de triglicéridos en el plasma de juveniles de *Litopenaeus vannamei*. En el plasma de las **hembras** ablacionadas unilateralmente, se detectó significativamente **menor** concentración de triglicéridos con **respecto** a **las hembras** controles. La **concentración** de **triglicéridos** en las **hembras** ablacionadas bilateralmente no son significativamente diferentes de las **hembras** controles y ablacionadas unilateralmente. En **los** machos, no se detectaron diferencias significativas en la **concentración** de triglicéridos (fig. 3a). Por otro **lado**, no se detectaron diferencias **significativas** ni por el tratamiento ni por **los** sexos en las concentraciones de colesterol (fig. 3b)

Se detectó una **interacción** significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones de glucosa en el plasma de juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Se detectó una concentración plasmática de glucosa significativamente mayor ($p < 0.05$) en **los** machos ablacionados unilateralmente con **respecto** a **los** machos ablacionados bilateralmente y controles. No se detectó diferencia significativa entre **los** machos controles y **los** machos ablacionados bilateralmente. En las **hembras** con ambos **tipos** de **ablación** las concentraciones de glucosa **fueron** significativamente **menores** con **respecto** a **los** controles (fig. 4a).

Se detectaron diferencias significativas ($P < 0.001$) en las concentraciones de lactato **debidas** al tratamiento. El **análisis** de **las** medias **globales** (**hembras** y machos) muestran que **los** organismos ablacionados unilateralmente tuvieron concentraciones significativamente **mayores** de lactato con **respecto** a **los** organismos ablacionados bilateralmente. Se detectó que la concentración promedio de **los** tres **grupos** de **hembras** ($6.32 \pm 1.2 \text{ mg/dl}$) es significativamente **más alta** ($P < 0.001$) que la de **los** machos ($3.54 \pm 0.51 \text{ mg/dl}$) (fig. 4b).

Se **detectó** una **interacción** significativa ($p < 0.02$) en las concentraciones de proteína en el plasma de juveniles de *Litopenaeus vannamei*. Los resultados muestran significativamente **mayores** concentraciones de proteína plasmática en **hembras** ablacionadas unilateralmente con **respecto** a las **hembras** controles. Por el **contrario**, existe significativamente **menores** concentraciones de proteína plasmática en machos ablacionados unilateralmente con **respecto** a **los** machos controles (fig. 5).

No se detectaron diferencias significativas ni por el tratamiento ni por **los** sexos en el número de hemocitos **totales** (fig. 6a). Con **respecto** a la actividad total (**Abs./min/ml** de hemolinfa) de la **pFO** celular, el promedio de **los** tres **grupos** de machos (0.057 ± 0.009) es significativamente más alta ($p < 0.05$) que la actividad total promedio de las **hembras** (0.044 ± 0.009) (fig. 6b). No se detectaron diferencias significativas **debidas al** tratamiento.

Se **observó** un efecto **significativo** del tratamiento ($p < 0.05$) **sobre** la **pFO** plasmática, **pero** no del **sexo**. La comparación de medias **globales** (machos y **hembras**) muestran una diferencia significativa entre **los** organismos controles y **los** ablacionados bilateralmente. Los organismos ablacionados unilateralmente presentaron valores **intermedios** que no **fueron** significativamente diferentes de **los** controles y **los** ablacionados bilateralmente (fig 7a). Con **respecto** a la FO, se **observó** una diferencia significativa **debida al** tratamiento ($p < 0.01$). El **análisis** de medias **globales** (machos y **hembras**) muestran una diferencia significativa entre **los** organismos ablacionados unilateralmente y **los** ablacionados bilateralmente. No se detectaron diferencias significativas entre la actividad de la FO en ambos sexos controles con **respecto a los** ablacionados (fig. 7b).

ANOVA		
Triglicéridos	F	P
Tratamiento	0.7853	NS
Sexo	0.0581	NS
Interacción	3.0732	< 0.05

ANOVA		
Colesterol	F	P
Tratamiento	2.0970	NS
Sexo	1.7641	NS
Interacción	0.8749	NS

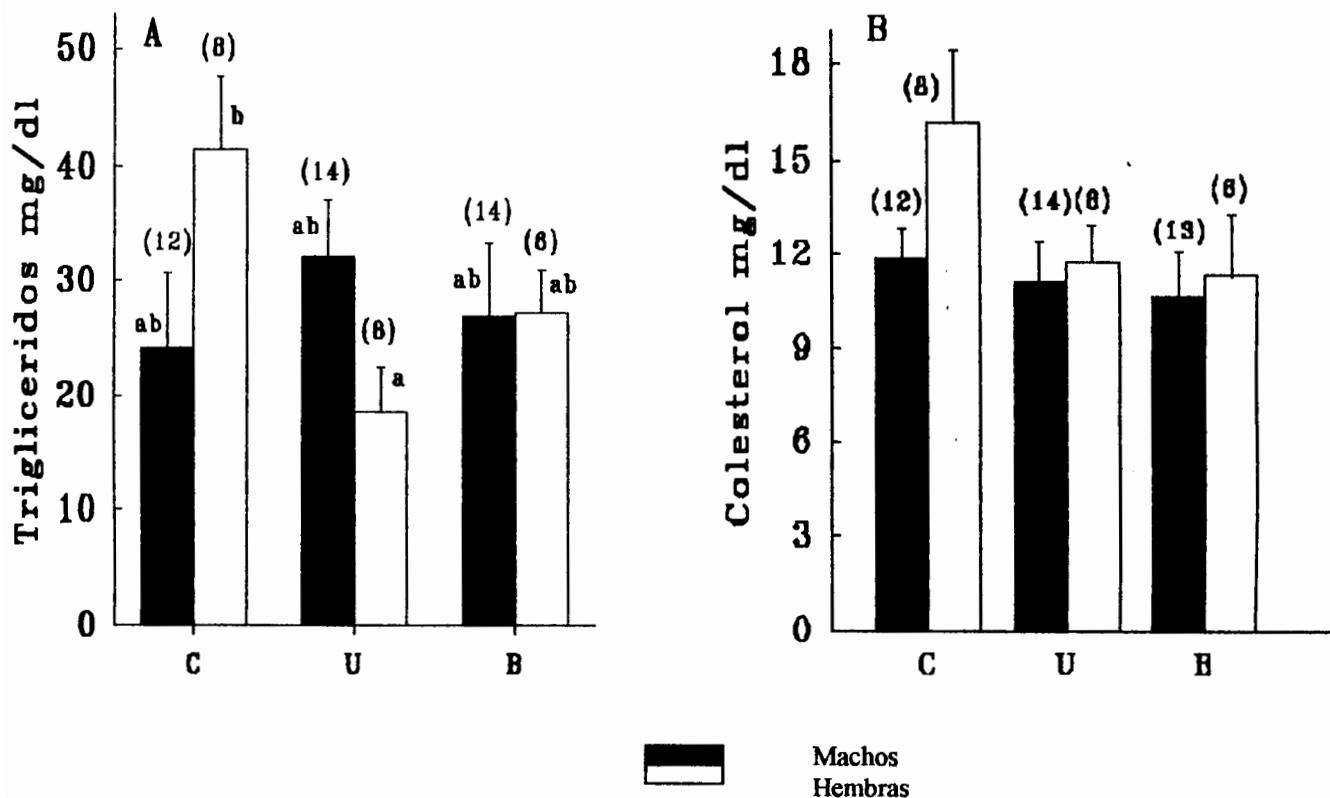


Fig. 3. Concentración de triglicéridos (A) y colesterol (B) en mg/dl de plasma del camarón blanco *L. vannamei* bajo ablación unilateral (U), bilateral (B) y controles (C). Se indica el valor promedio y el error estándar. Las letras sobre las barras cuando no son similares indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

ANOVA		
Glucosa	F	P
Tratamiento	2.3092	NS
Sexo	0.0434	NS
Interacción	3.7523	< 0.05

ANOVA		
Lactato	F	P
Tratamiento	9.9376	< 0.001
Sexo	22.1127	<< 0.001
Interacción	0.9807	NS

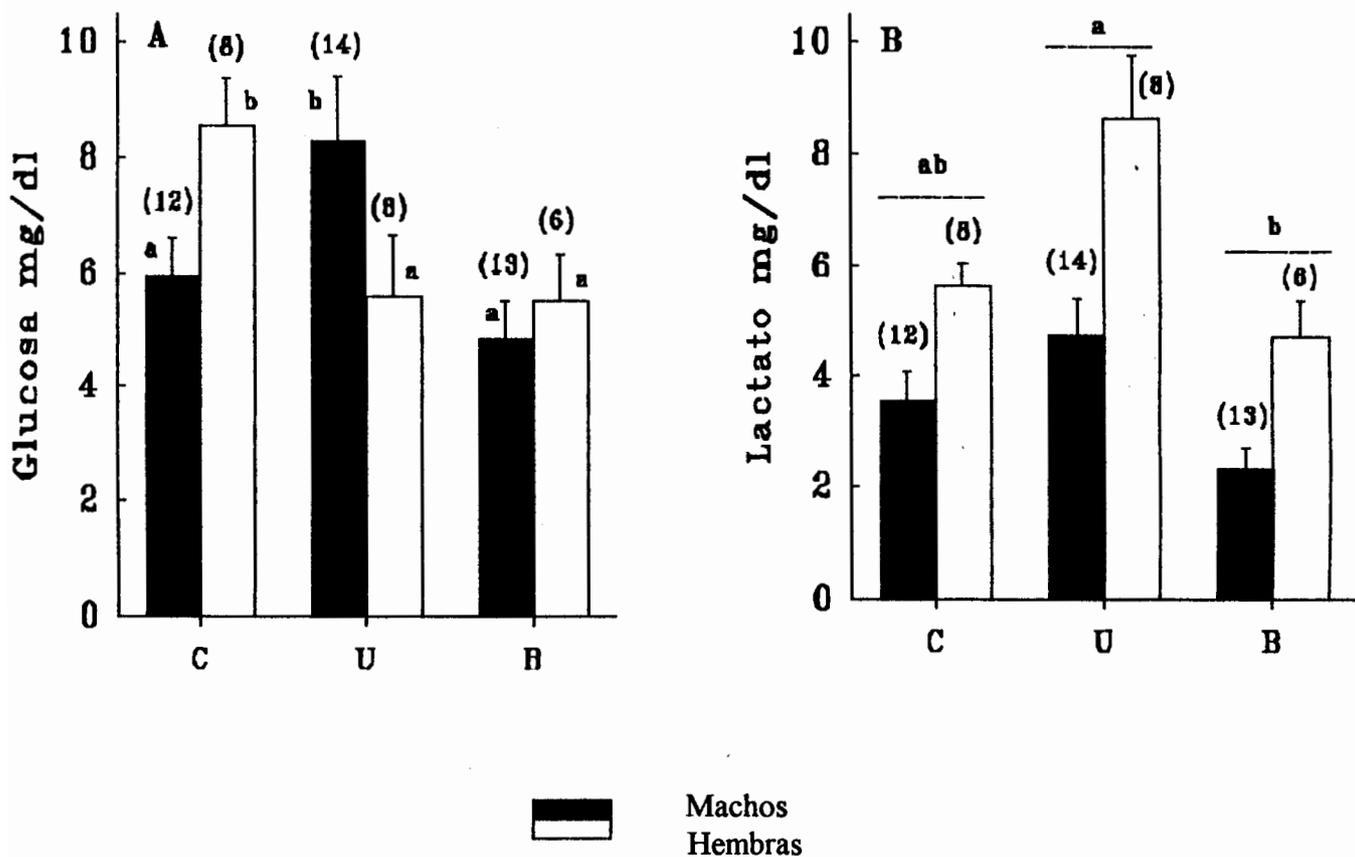


Fig. 4. Concentración de glucosa (A) y lactato (B) en mg/dl de plasma de camarón blanco *L. vannamei* ablacionados unilateralmente (U), bilateralmente (B) y controles (C). Se indica el valor promedio, el error estandar y el número de organismos (). Las letras sobre las barras cuando no son similares indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

ANOVA

Proteína	F	P
Tratamiento	0.4968	NS
Sexo	0.0004	NS
Interacción	4.6924	< 0.02

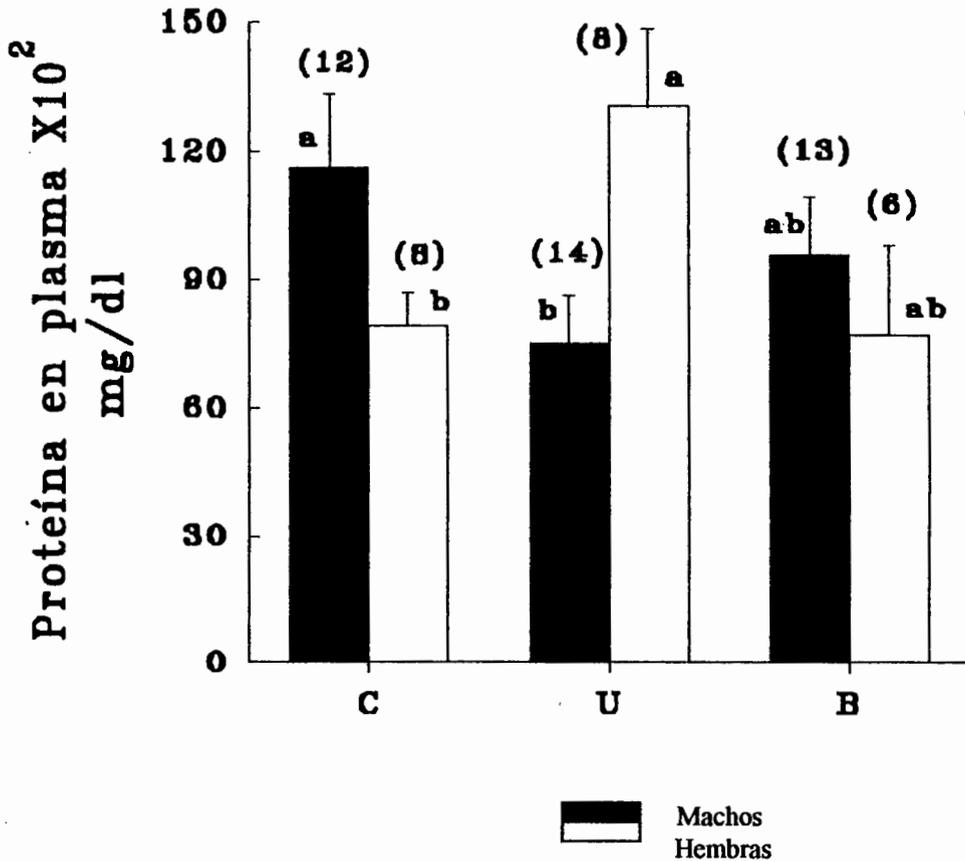


Fig. 5. Concentración de proteína en mg/dl de plasma del camarón blanco *L. vannamei* ablacionado unilateralmente (U), bilateralmente (B) y controles (C). Se indica el valor promedio, el error estándar. Las letras sobre las barras cuando no son similares indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

ANOVA		
No. hemocitos	F	P
Tratamiento	0.7366	NS
Sexo	1.0251	NS
Interacción	0.4659	NS

ANOVA		
pFO celular	F	P
Tratamiento	0.6122	NS
Sexo	4.4415	< 0.05
Interacción	1.0124	NS

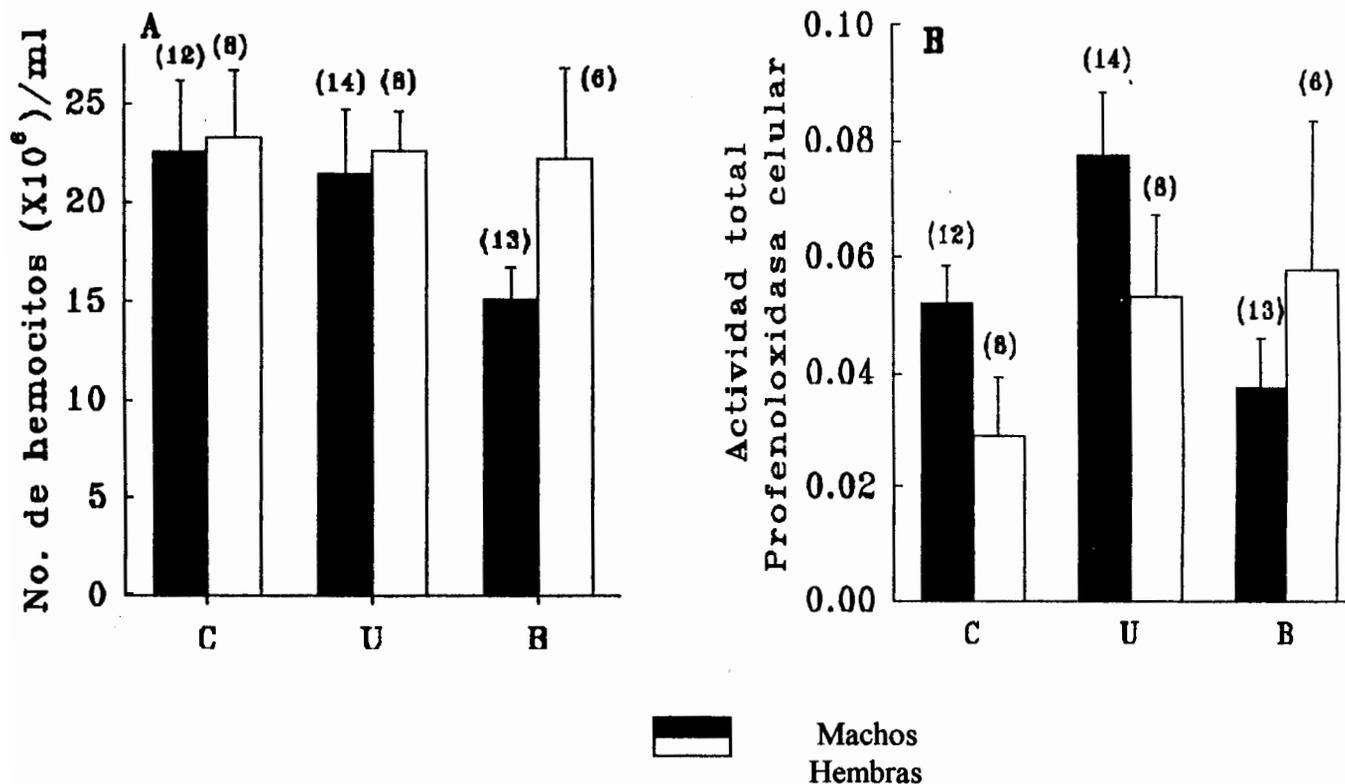


Fig. 6. Contéo de hemocitos (A) y actividad total (abs/min/ml de hemolinfa) de la profenoloxidasa celular (B) en el camarón blanco *L. vannamei*. Ablación unilateral (U), bilateral (B) y controles (C). Se indica el valor promedio, el error estandar y el número de organismos ().

ANOVA		
pFO en plasma	F	P
Tratamiento	3.4569	< 0.05
Sexo	0.2115	NS
Interacción	0.178	NS

ANOVA		
FO	F	P
Tratamiento	5.1615	< 0.01
Sexo	0.9492	NS
Interacción	2.5255	NS

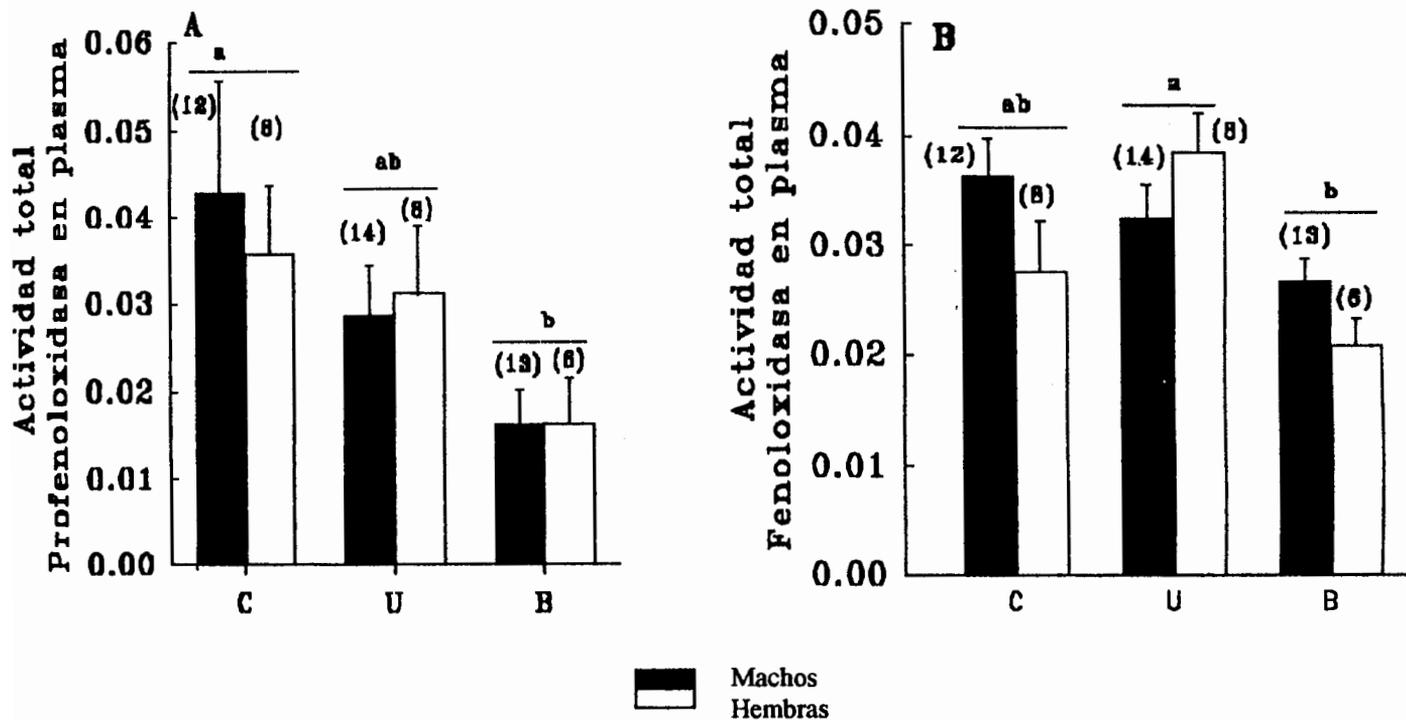


Fig 7. Actividad total (abs/min/ml de hemolinfa) de la profenoloxidasa (A) y fenoloxidasa (B) plasmáticas en el camarón blanco *L. vannamei*. Ablación unilateral (U), bilateral (B) y controles (C). Se indica el valor promedio, error estandar y el número de organismos (). Las letras sobre las barras cuando no son similares indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Capitulo IV

Discusión ----- 37

Conclusiones ----- 46

Referencias ----- 49

Discussion

La ablacion del pedunculo ocular es la **práctica** mas comun para acelerar el desarrollo de la gonada femenina en *L. vannamei* (Guller *et al.*, 1992). Sin embargo, **además** de acelerar el **desarrollo** de la **gónada**, **los** numerosos procesos que mantienen el estado de homeostasis en el desarrollo normal del camaron se **alteran** con la ablacion.

En este trabajo se observaron dos periodos principales de mortalidad: el **primero** ocurrio dentro de las **4 hrs** despues de la ablacion, y el segundo **ocurrió** en la ecdisis siguiente a la ablacion. Las **muerres ocurridas** en esta **etapa** sugieren que por el descontrol hormonal, la muda no se realizo correctamente y **los animales** murieron. Chang (1989) menciona que la ablacion es un proceso **traumático** por el **corte** del pedunculo ocular. Se menciona tambien que despues de la ablacion ocurre un proceso de desbalance hormonal (Beltz, 1988; Chang 1992; Fingerman 1995). Aunque no sucede siempre la practica de la ablacion del pedunculo ocular produce mortalidades de organismos (Bray y Lawrence, 1992).

Chan *et al.* (1988) **reportan** que en el ciclo de muda de *L. vannamei*, la premuda dura aproximadamente 53% y la intermuda aproximadamente el **40%** del total del ciclo. **Tomando** en cuenta esta referencia, en **los** organismos controles se observo un ciclo de muda con un periodo de **24** dias, de **los** cuales la premuda duro **aproximadamente 12.7** dias, la posmuda **1.5** dias y la intermuda **9.6** dias. En ambos sexos se detectó un **decremento** en la **duración** del ciclo de muda despues de ser ablacionados. No se observaron diferencias **significativas** entre **los** sexos, presentando ambos grupos ablacionados unilateralmente un promedio de **14** dias y ambos grupos ablacionados bilateralmente un promedio de **10** dias. La **disminución** en el

tiempo del ciclo de muda concuerda con **los** resultados obtenidos en *L.stylirostris* y *P. setiferus* (Robertson et *al.*, 1987). Chang y O'Connor (1988) y Lachaise et al. (1993) reportan que la eliminacion de la MIH **permite** la sintesis y **secreción** de 20-hidroxiecdisterona, promoviendo así un aceleramiento del ciclo de muda. Los cambios significativos en **cada** uno de **los** grupos ablacionados, sugieren que la disminucion en **los** tiempos del ciclo de muda en **los** organismos bilaterales es debido a la total eliminacion de la MIH, mientras que en organismos unilaterales existe MIH, la cual tiene un control parcial **sobre** la sintesis de 20-hidroxiecdisterona y **sobre** la muda (Shin-Ichi et *al.*, 1988).

La **concentración** de colesterol no mostro **variación** significativa ni entre **los** sexos ni por el **tratamiento**. La produccion de 20-hidroxiecdisterona requiere del colesterol. Debido al aceleramiento del ciclo de muda observado en nuestro experimento, existe una mayor produccion de 20-hidroxiecdisterona. Sin embargo, aunque esta produccion se llevo a cabo, la captacion de colesterol para esta produccion no afecto las concentraciones en la hemolinfa. La **cantidad** de colesterol captada para la sintesis de 20-hidroxiecdisterona en el OY ($\mu\text{g/ml}$), no es una **cantidad** significativa con **respecto al** total de colesterol en el plasma (mg/ml) (Chang, 1985; Chang y O'Connor, 1988). Es necesario **utilizar** tecnicas **más** sensibles para la **medición** de colesterol a estos niveles y a niveles de la **utilización** de estos compuestos en estructuras celulares. **Al** parecer el colesterol es abundante en el **alimento** que **consumen los** camarones y es suficiente para **cubrir** esta demanda en juveniles bajo condiciones de ablacion.

Los cambios metabolicos que **ocurren** en organismos adultos con la ablacion unilateral, estan relacionados con la **reproducción** (Charniaux-Cotton y Payen, 1988; Fingerma, 1995). En *Penaeus japonicus* se ha observado una acumulacion de reservas (lipidos y carbohidratos)

en el hepatopancreas y musculo durante la **primera** fase del **desarrollo gonádico** (Shin-Ichi et al., 1988). En *Crangon crangon* se observa una síntesis de lipoproteinas y su **transporte** a la gonada (Spaargaren y Haefner Jr., 1994). La disminucion de la VIH en la **hemolinfa**, los ecdisteroides secretados por el OY y las **hormonas** estimulantes de la **vitelogénesis** producidas en el **cerebro** y ganglio toracico, disparan el proceso de **reproducción** despues de la ablacion en las **hembras** (Charniaux-Cotton y Payan, 1988; Fingerman, 1995). La **baja** concentracion de **triglicéridos** en **hembras** ablacionadas unilateralmente, puede ocurmr por una serie de eventos que no son **claros** por el hecho de que no se **midió** su síntesis o su utilizacibn en otros tejidos como el hepatopancreas o en la gonada, **si** esta estaba presente. La **medición** de **su** síntesis o **su utilización** en estos organos, nos **permitiría** conocer **si bajo** estas circunstancias, **los** trigliceridos son almacenados, utilizados como constituyentes celulares o utilizados en la obtencion de energia.

Con la ablacion del pedunculo ocular se elimina la hormona neurodepresora (NDH), por lo que el **organismo** es **sometido** a **una** mayor actividad. En **los** organismos ablacionados unilateralmente se observo una movilidad continua en el fondo de **los** tanques, **los** organismos bilaterales mostraron ciclos de mayor movimiento en la **superficie** de **los** tanques y en **los** controles se **observó** un ciclo normal con actividad por las noches y poca actividad en el dia. Por otro **lado**, se **detectó** que en ambos sexos ablacionados unilateralmente hay mayor concentracion de lactato con **respecto** a **los** organismos ablacionados bilateralmente. Esto nos **sugiere** que machos y **hembras** ablacionados unilateralmente, obtienen mayor **cantidad** de energia por la via anaerobia posiblemente debido a la actividad muscular. La **baja** concentracion de lactato en **los** organismos bilaterales es posible que **ocurra** porque se **reprime**

la fuente principal de CHH la cual **controla** la movilización de glucosa.. En *Chasmagnathus granulata* (Schmitt y Santos, 1993; Santos et *al.*, 1997) y *C. maenas* (Santos y Keller, 1993a) se ha observado que el lactato es un **fberte promotor** de la **secreción** de CHH, y por ende de la movilización de glucosa (Liischen et *al.*, 1993; Santos y Keller., 1993a). Por otro **lado**, también se observó una mayor **producción** promedio de lactato en el plasma de las **hembras** ablacionadas y controles con **respecto a los** machos, indicando que las **hembras** obtienen mayor **cantidad** de energía por la vía anaerobia, posiblemente porque las **hembras** ablacionadas mantienen mayor actividad muscular, o son más susceptibles **al** estrés, o incluso, obtienen mayor energía por esta vía para satisfacer la demanda de energía durante la reproducción.

Rosas et *al.* (1993) reporta que **después** de la ablación en **hembras**, aumenta el ritmo respiratorio y la energía fisiológicamente utilizable, esto puede **significar** una mayor **oxidación** de la glucosa para obtener energía. La hiperglucemia en machos e hipoglucemia en **hembras** observados, **tienen relación** con **los resultados** obtenidos en *P. notialis* (Rosas et *al.*, 1993). En machos ablacionados, no hay un aumento en **los** requerimientos de energía. Ellos concluyen en que estas diferencias pueden ser **debidas** a la reproducción. **La** ablación induce la maduración gonádica en las **hembras**, en machos la **información** ha sido inconsistente. **Según** Chang (1992), **existe** una espermatogénesis precoz con la ablación del **tallo** ocular en machos. Gendrop-Funes y Valenzuela-Espinoza (1995) mencionan que en *L. vannamei* ocurre un aumento en el número de espermatozoides en **los** machos ablacionados. **Al** parecer estos eventos no son tan demandantes del **consumo** de energía **como** la reproducción en **hembras** (Rosas et *al.*, 1993).

La hiperglucemia observada en machos juveniles de *L. vannamei* después de la ablación unilateral, sugiere que **existen** elementos que promueven un aumento en **los niveles** de glucosa

en el plasma. La hiperglucemia esta controlada por la CHH, y la CHH es controlada por **factores externos** como la temperatura, la luz, el **alimento** (Chang, 1989) y **factores internos** como el lactato (Santos y Keller, 1993a) y las monoaminas serotonina, dopamina, epinefiina y norepinefiina (Lüschen et *al.*, 1993; Kuo et *al.*, 1995). Sin embargo, **sobre las monoaminas** no se sabe su comportamiento despues de la ablacion y no se ha concretado **sobre** sus efectos colaterales y otras **funciones** en el organismo (Kuo et al., 1995). Santos y Keller (1993a) **reportan** que en Orconectes *limosus* durante periodos de anoxia, la CHH aumenta drasticamente sin una **elevación** de la glucosa plasmatica. Los autores sugieren que la glucosa en el plasma es **rápidamente** consumida, de tal **manera** que se previene una **elevación** en la concentracion. **Al** parecer, en este trabajo la glucosa en el plasma **de hembras unilaterales**, promovida por la alta **concentración** de lactato, **fue** consumida por varios factores: la **demand**a de energia requerida para **movimiento** muscular como se **observó** en *Crangon crangon* (Chang y O'Connor, 1983), en la reproduccion en Penaeus *setiferus* (Rosas et *al.*, 1995) y en la muda en Astacus *leptodactylus* (Chang, 1989). El monto de glucosa que se consume por la via del **ácido láctico** para producir la misma **cantidad** de energia, es 18 **veces** mas alto que en la via aerobia (Lehninger, 1980). **Existen** tambien indicios de que en la reproduccion tras la ablacion del pedunculo ocular, **se** sintetizan lipidos en el hepatopancreas de **hembras a partir** de glucosa (Chang y O'Connor, 1988). El aumento en la concentracion de glucosa en el plasma de machos unilaterales es debido a que no hay una alta demanda de este **metabolito energético** como en las **hembras**.

La **eliminación parcial** del complejo OXSG (ablacion unilateral) dispara procesos importantes en **hembras**, y a la vez con el OXSG que queda, es posible apoyar energeticamente

con la **acción** de promotores de la **CHH** como el **lactato**. En **los** bilaterales no existe OXSG alguno, y aunque **existan factores** activadores de la CHH, el proceso de **hiperglucemia** no tiene lugar por esa vía. Sin embargo, Luschen *et al.* (1993) **reportan** que la serotonina, epinefrina, norepinefrina y **octopamina** elevan la concentración de glucosa en la hemolinfa de *Carcinus maenas* sin **promover** la CHH. Es posible que en organismos ablacionados bilateralmente se de el control de la glucosa por alguno de estos compuestos.

Se **observó** una **interacción** significativa en la concentración de proteína total en plasma, lo **cual** significa una diferencia en el metabolismo de las proteínas entre machos y **hembras**. Después de la ablación unilateral se **detecto** significativamente mayor concentración de proteína en el plasma de **hembras** ablacionadas unilateralmente y significativamente **menores** en el plasma de machos unilaterales con **respecto** a **los** controles. Esta diferencia puede ser por la producción de proteínas específicas como **hemocianina** o vitelogenina en **hemolinfa**, hepatopancreas, tejido adiposo o **gónadas**. Browdy *et al.* (1990) y Van-Herp (1992) **reportan** que después de la ablación, aumenta la capacidad para obtener **mayores** cantidades de aminoácidos a **partir** del **alimento** y aumenta también la capacidad para sintetizar lipoproteínas. Quackenbush (1989) y Browdy *et al.* (1990) mencionan que con la ablación del tallo ocular en adultos de *L.vannamei* se **promueve** la síntesis de vitelogenina, en el ovario, en el tejido subepitelial adiposo y en el hepatopancreas. Sin embargo, **los** niveles encontrados de vitelogenina en la hemolinfa son del **orden** de $\mu\text{g/ml}$ (Shafir *et al.*, 1992), **mientras** que las proteínas **totales** se encuentran en **mg/ml**. Wilder (1995) **reporta** que la ablación de juveniles de *Macrobrachium rosenbergii* resulta en la producción de **vitelina** en **ambos** sexos. Por otro **lado**, Rosas *et al.* (1993) menciona que en **sus** estudios con machos y **hembras** de *Penaeus notzalis*, la ablación unilateral en **hembras**, causa un aumento en el **consumo**

de O_2 para satisfacer **los** requerimientos de energía inducidas por la ablación. El aumento en el **consumo** de O_2 trae **como** consecuencia un aumento en la **concentración** y uso de hemocianina (Hagerman y Webster, 1981; Van-Aardt y Wolmarans, 1987), que es la proteína más abundante en la hemolinfa durante la **etapa** de intermuda (Shin-Ichi *et al.*, 1988). Palacios *et al.* (en prensa) **trabajando** con **hembras adultas** de *L. vannamei* ablacionadas unilateralmente, encuentran **menores** concentraciones de hemocianina y explican que es posible que las **hembras** ablacionadas **consuman** mayor **cantidad** de hemocianina por **los** desoves más **frecuentes** que las **hembras** no ablacionadas.

El sistema hormonal tiene una gran importancia en el control de múltiples **procesos** metabólicos, y **cada** factor hormonal **controla** uno o dos aspectos del equilibrio químico corporal (Chang, 1992). En **crustáceos**, la ablación del pedunculo ocular provoca un descontrol de sistemas metabólicos; se **dejan** de producir **algunas** sustancias con **actividad biológica**, y en su lugar se producen otras, pudiendo **existir algún** efecto **sobre** el sistema de defensa de **los** crustáceos (Moullac *et al.*, 1997).

El número de hemocitos **totales** (NHT) no mostro **variación significativa** ni entre **los** sexos ni por el **tratamiento**. La **información sobre** variaciones en el NHT después de la ablación es escasa. Con fines de diagnosticar un estado de descontrol hormonal, enfermedad o de susceptibilidad a adquirir una **infección** por **parte** de **los** camarones, el NHT **podría** ser un buen **parámetro** (Vargas-Albores, 1995). Sin embargo, **los** hemocitos granulares y semigranulares parecen tener mayor relevancia en la defensa de **los animales** ante infecciones porque en sus granulos se encuentra el sistema **pFO** y otras proteínas que apoyan la defensa (Smith y **Söderhäll**, 1983; Soderhall *et al.*, 1986; Johanson y **Söderhäll**, 1989). Por esta **razón**, el porcentaje de hemocitos granulares y hialinos puede ser más importante que el NHT (Moullac *et al.*, 1997).

Sobre esto, se reporta una **variación** importante entre especies. Moullac et *al.* (1997) mencionan que en *Penaeus stylirostris* los hemocitos **hialinos** comprenden un **80%**, los **semigranulares** 10% y los **granulares** 10% del total de hemocitos, mientras que **Vargas-Albores** (1995) menciona que para *Penaeus californiensis*, el **grupo** de hemocitos granulares comprende el 80% y las células hialinas el 20% del total de hemocitos.

Con **respecto** al sistema **pFO**, en el **experimento** no se indujo **ninguna activación** via componentes no propios del organismo, las mediciones se realizaron en estado basal. Los resultados **sugiere** que el nivel de **ablación** (unilateral o bilateral) no produce un efecto diferente **sobre** la **pFO** celular. Sin embargo, el promedio de la actividad de la **pFO** celular en los machos tratados y controles, es significativamente mas alto que en las **hembras**. **La información** sobre el comportamiento de la **pFO** celular entre **hembras** y machos es escasa. Sin embargo, la diferencia puede ser debida a que los machos **tienen** una mayor **proporción** de células granulares con **respecto** a las hialinas **y/o** una mayor **producción** por **cada** hemocito granular. Considerando que la **pFO** celular es el precursor de la enzima en el plasma, los machos **podrían** tener mayor posibilidad de sostener una **secreción** de esta enzima **al** plasma ante la presencia de agentes **extraños**.

Se ha observado que la **pFO** se encuentra exclusivamente en los hemocitos de **crustáceos** (Johanson y **Söderhäll**, 1989; **Aspán** et *al.*, 1990; **Lanz et al.**, 1993) y no en el plasma como ocurre en algunos insectos (Ashida, 1990). En machos y **hembras** se **detectó menor** actividad total en la **pFO** plasmática con **respecto** al **grado** de **ablación**. Sin embargo, solo la actividad total de la **pFO** plasmática en **hembras** y machos ablacionados bilateralmente es significativamente **menor** con **respecto** a los controles. Es posible que la **pFO** encontrada en el

plasma, sea por razones metodológicas. En el proceso de **separación** de los hemocitos del plasma y en **extracción** del sistema **pFO** de los hemocitos se utiliza la **centrifugación**. En la **centrifugación** para **separar los** hemocitos del plasma, la **pFO** pudo haber salido de los hemocitos al plasma, y durante la **centrifugación** para vaciar el contenido celular, es posible que no saliera toda la **pFO**. La **pFO** no se **activó** en el plasma porque **éste** se encontraba en una **solución** con EDTA, el cual quela el Ca^{++} y no **permite** la **formación** de FO (Ashida y Soderhall, 1984). Por otro **lado** es posible que tras la ablacion **ocurran** cambios en el proceso de la exocitosis de **pFO al** plasma. Cuando no hay **factores** del OXSG por la ablacion bilateral, la exocitosis se ve desfavorecida.

Se **detectó** significativamente mayor **actividad de** la FO en las **hembras** ablacionadas unilateralmente con **respecto** a las **hembras** ablacionadas bilateralmente. Para activar la FO se requiere de un sistema en cascada en el **cual participa** una proteasa **sérica** (Soderhal y Smith, 1986), el Ca^{++} (Gollas-Galvan *et al.*, 1997) y las proteínas de union (Johanson y **Söderhäll**, 1988; Lanz *et al.*, 1993; Vargas-Albores *et al.*, 1993). La **participación** del sistema **endócrino** en el control de **alguno** de estos elementos no ha sido bien estudiada. Sin embargo, es posible que en la activacion del sistema **pFO** actuen **hormonas** sintetizadas en el **complejo** OXSG y esta activacion se ve alterada con la ablacion del tallo ocular en *L.vannamei*.

Conclusiones

El tiempo en el ciclo de muda se ve afectado de **manera** significativa por la ablacion. Este disminuye **según** el grado de ablacion, evidenciando la actividad de la MIH. La disminucion en el tiempo del ciclo de muda no es significativamente diferente entre **hembras** y machos.

La **ablación** del tallo ocular **al** segundo día despues de la **ecdisis** en **los** organismos juveniles, provocb una mortalidad durante el primer ciclo de muda **siguiente** a la ablacion. 2% en controles, 33% en unilaterales y 68% en organismos ablacionados bilateralmente. Esta mortalidad va en aumento **según** el grado de ablacion, y es mayor en **hembras**. Para fines de **experimentación** o de **producción**, Csto indica que no se puede tener organismos ablacionados bilateralmente por periodos prolongados.

Las interacciones significativas detectadas en las concentraciones de trigliceridos, glucosa y proteina, indican que el efecto de la ablacion **sobre** estas variables, es dependiente del sexo. La concentracion de glucosa es significativamente mayor en machos ablacionados unilateralmente, **mientras** que en **hembras** ablacionadas unilateralmente y bilateralmente solo se **observa** una tendencia por bajas concentraciones. Esto nos indica **una** acumulacion de glucosa en el plasma de machos ablacionados unilateralmente, mientras que en las **hembras** hay un **consumo** por parte de **los** organismos ablacionados.

El efecto de la ablacion **sobre** la concentracion de **triglicéridos** es dependiente del sexo. En **hembras** ablacionadas unilateralmente la concentracion es significativamente mas baja que en **hembras** controles. Esto significa una utilizacibn de **triglicéridos** por parte de **las hembras** ablacionadas unilateralmente. Sin embargo, no es posible concluir **si** esta disminucion es por un

almacenamiento, una **utilización** como constituyentes celulares o si son utilizados para la obtención de energía.

El efecto de la ablación **sobre** la concentración de proteína es dependiente del sexo. Las **hembras** ablacionadas unilateralmente presentan altas concentraciones de **proteína**, mientras que **los** machos unilaterales presentan bajas concentraciones. Esto puede significar una mayor síntesis de **diversas** proteínas como lipoproteínas y hemocianina en **hembras** unilaterales. Sin embargo, es necesario enfocarse en la **medición** de proteínas específicas para concluir en **forma** más clara.

Al parecer, el colesterol (**mg/ml**) no es utilizado en cantidades significativas para la síntesis de esteroides (**µg/ml**) o para la conformación de estructuras celulares. **Existe** suficiente **cantidad** de colesterol en la dieta para satisfacer las **demandas** de **los** procesos inducidos por la ablación.

Con **respecto al** lactato, **los** organismos machos y **hembras** ablacionados unilateralmente, **tienen** significativamente mayor concentración que **los** organismos ablacionados bilateralmente, estas concentraciones también son **mayores** que en **los** organismos controles, **pero** no son **significativos**. Esto nos sugiere que se estimula la producción de energía por la vía del ácido **láctico** en **los** organismos ablacionados unilateralmente, mientras que en bilaterales se **inhibe** esta vía. **También** hay significativamente mayor concentración de lactato en **hembras**. Esto significa que las **hembras** ablacionadas unilateralmente y las **hembras** en general, son más susceptibles **al** estrés.

El número de hemocitos **totales** se mantuvo sin **cambio** y no es diferente entre **hembras** y machos. Esto nos indica que el número de hemocitos **totales** no es afectado, por lo **menos** directamente por la ablación unilateral o bilateral.

En la actividad total de la **pFO** celular, no hay diferencias significativas **debidas** a la ablacion. Sin embargo, **los** machos presentan significativamente mayor actividad de la **pFO** que las **hembras**. Esto puede ser debido a ~~que en machos~~ **existe** un mayor **porcentaje** de hemocitos granulares o que existe una mayor **producción** de **pFO** por unidad celular.

Conciderando el error metodologico, la **pFO** en el plasma es dependiente del grado de **ablación**. Los organismos machos y **hembras** ablacionados bilateralmente **tienen** significativamente **menor** actividad total que **los** controles. Esto nos **sugiere** que **existe** una **menor** secrecion de **pFO** **al** plasma cuando se eliminan **los** OXSG. Es posible que se requiera **algún** factor o **factores** del OXSG para permitir mayor facilidad en la secrecion de **pFO** al plasma. Por otro **lado**, hay una mayor conversion de **pFO** a FO en organismos ablacionados unilateralmente, principalmente en **hembras**.

REFERENCIAS

- Aguilar M.B., Quackenbush L.S., Hunt D.T., Shabanowitz J. y Huberman A. 1992. **Identification, purification and initial characterization** of the **vitellogenesis-inhibiting** hormone from the **mexican** crayfish *Procambarus* bouvieri (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol., 102B (3), 491-498.
- Ashida M. 1990. The prophenoloxidase cascade in insect immunity. Res. Immunol., 141, 908-910.
- Ashida M. 1981. A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm *Bombyx* mori. Insect Biochem., 11, 57-65.
- Ashida M. y **Söderhäll** K. 1984. The prophenoloxidase activating system in crayfish. Comp Biochem. Physiol., 77B (1), 21-26.
- Aspán** A., Hall M. y **Söderhäll** K. 1990. The effect of endogeneous proteinase inhibitor; on the profenol-oxidase activating enzyme, a **serine** proteinase from crayfish haemocytes. Insect Biochem., 20 (5), 485-492.
- Beltz B.S. 1988. Crustacean neurohormones. pp. 235-258. En: Endocrinology of selected invertebrates types. (Alan R. Liss ed). Academic press. NY., USA.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Bray W.A. y Lawrence A. 1992. Reproduction of *Penaeus* species in captivity. pp. 93-170. Marine shrimp culture: Principles and practices. (A.W Fest y L.J. Lester eds). Elsevier. USA.
- Browdy C.L., **Fainzilber** M., Tom M., Loya Y. y Lubzens E. 1990. Vitellin synthesis in relation to oogenesis in In vitro-incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). J. Exp. Zool., 255, 205-215.
- Chang E.S. y **O'Connor** J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. pp. 263-281. En: The Biology of Crustacea. Vol 5. (D.E. Bliss y L.H. Mantel eds). Academic Press. NY., USA.
- Chang E.S. y **O'Connor** J.D. 1988. Crustacean: Molting. pp. 259-278. En: Endocrinology of selected invertebrates types. (Alan R. Liss ed). Academic press. NY., USA.
- Chang E.S. 1985. Hormonal control of molting in decapod crustacea. Amer. Zool., 25, 179-185.
- Chang E.S. 1989. Endocrine regulation of molting in crustacea. Aquat. Sci., 1, 131-157.

- Chang E.S. 1992. Endocrinology. pp. 53-91. En: Marine shrimp culture: Principles and practices. (A.W Fest y L.J. Lester eds). Elsevier. USA.
- Charniaux-Cotton H.** y **Payen G.** 1988. Crustacean reproduction. pp. 279-303. En: Endocrinology of selected invertebrates types. (Alan R. Liss ed). Academic press. NY., USA.
- Ching-Ming **K., Ching-Rong H.** y Chung-Yen L. 1995. Hyperglycaemic effect of **dopamine** in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture, 135, 161-172.
- Dall W. 1981. Lipid absorption and utilization in the **Norwegian** lobster, *Nephrops norvegicus* (L). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 50, 33-45.
- Dall W. y Moriarty D.J.W. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. pp. 215-251. En: The biology of crustacea Vol. 5. (D.E. Bliss y L.M. Mantel eds). Ademic press, NY., USA.
- Fingerman M. 1988. Pigment hormon in crustacean. pp. 357-374. En: Endocrinology of selected invertebrates types. (Alan R. Liss ed). Academic press. NY., USA.
- Fingerman M. 1995. Endocrine mechanisms in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. **Amer. Zool.**, 35, 68-78.
- Gendrop-Funes V. y **Valenzuela-Espinoza E.** 1995. Unilateral ablation of *Penaeus stylirostris* (Stimpson). Ciencias Marinas, 21 (4), 401-413.
- Gollas-Galvan T., **Hernández-López J.** y Vargas-Albores F. 1997. Effect of calcium on the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) prophenoloxidase system activation. Comp. Biochem. Physiol., 117A, 419-425.
- Hagerman L.** y Weber R.E. 1981. Respiratory rate, haemolymph oxygen tension and haemocianin level in the shrimp *Paleomon adspersus*. J Exp. Mar. Biol. Ecol., 54, 13-20.
- Hernandez-Lopez J., Gollas-Galvan T. y Vargas-Albores F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol., 113 (1), 1-6.
- Huberman A. 1996. Neurodepressing hormone (NDH): fact or fiction?. pp. 1-17. En: Crustaceana, Vol. 69. (E.J. Brill y **Leiden** eds).
- Jankovic V.D.** 1994. Neuroimmunomodulation, **from** phenomenology to molecular evidence. pp. 1-38. En: Annals New York academy of sciences. NY., USA.
- Johanson M.W. y Sodelhall K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the **proPO** system. Parasitol. Today, 5 (6), 171-176.

- Kallen J.L., Rigiani N.R. y Trompenaars H.J.A.J. 1988. Aspects of entrainment of **CHH** cell activity and hemolymph glucose levels in crayfish. *Biol. Bull.*, 175, 137-143.
- Kallen J.L., **Abrahamse** S.L. y **Herp** F.V. 1990. Circadian rhythmicity of the Crustacean hyperglycemic Hormone (CHH) in the hemolymph of crayfish. *Bioll. Bull.*, 179, 351-357.
- Keller R. y Sedlmeier D. 1988. A metabolic hormone in crustaceans: the hyperglycemic neuropeptide. pp. 315-326. En: *Endocrinology of selected invertebrates types*. (Alan R. Liss ed). Academic press. NY., USA.
- Kopacek P., **Gruhoffer** L. y Soderhall K. 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for **lipopolysaccharides** from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 17, 407 - 418.
- Lachaise** F., Le Reux A., Hubert M, y **Lafont** R. 1993. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (A review). *J. Crust. Biol.*, 13 (2), 198-234
- Lanz** H., **Hernández** S., Gerrero E.G., Tsutsumi V. y Arechiga H. 1993. Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Dev. Comp. Immunol.*, 17, 399-406.
- Lehninger** A.L. 1980. *Bioquímica. OMEGA. España*. 972 p.
- Leonard C., **Söderhäll** K. y Ratcliffe N.A. 1985. Studies on prophenoloxidasa and **protease** activity of **Blaberus** cranufer hemocetes. *Insect. Biochem.*, 15, 803'-810.
- Liischen W., Willing A. y Jaros P.P. 1993. The role of biogenic **amines** in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105 (2), 291-296.
- Moullac G.L., Groumellec M.L., Ansquer D., Fraissard S., Levy P. y **Aquacop**. 1997. Haemathological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the molt cycle: protection against vibriosis. *Fish shellfish immunol.*, 7, 227-234.
- Muramoto A. 1988. Endocrine control of water balance in decapod crustaceans. pp. 341-356. En: *Endocrinology of selected invertebrates types*. (Alan R. Liss ed). Academic press. NY., USA.
- Olafsen J.A. 1988. Role of lectins in invertebrate **humoral** defense. *American Fish. Soc.* (Special publication), 18, 189-205.
- Palacios E., **Carreño** D., **Rodríguez-Jaramillo** M.C. y Racotta I.S. (En Prensa) Effect of **eyestalk** ablation on maturation, larval performance, and biochemistry of white pacific shrimp *Penaeus vannamei* broodstock. *J. Applied Aquaculture*.

- Panerai A.E. 1994. Problems and perspectives in the approach to **neuroendocrine-immuno-**modulation studies. pp. 81-84. En: Annals New York academy of sciences. NY., USA.
- Panouse J.B.** 1943. Influence de l'ablation du **péduncule oculaire** sur la croissance de l'ovaire chez la crevette *Leander serratus*. CR Acad. Sci. Paris, **217**, 553-555.
- Quackenbush L.S. 1989. Yolk production in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. J. Crust. Biol., **9** (4), 205-209.
- Ratcliffe N.A., White K.N., **Rowley A.F.** y Walters J.B. 1982. Cellular defense system of the arthropoda. A comparative treatise. pp. 167-255. En: The reticuloendothelial system, Vol. 3. (N. Cohen y M. Sigel eds). Plenum press. NY., USA.
- Robertson L., Bray W., **Leung-Trujillo J.** y Lawrence A. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. J. World Aquaculture Soc., **18** (3), 180-185.
- Rosas C., Sanchez A., Escobar E., **Soto L.** y Bolongaro-Crevenna A. 1992. Daily variations of oxygen consumption and glucose hemolymph level related to morphophysiological and ecological adaptation of crustacea. Comp. Biochem. Physiol., **101A** (2), 323-328.
- Rosas C., Fernandez I., Brito R y **Diaz-Iglesias E.** 1993. The effect of **eyestalk** ablation on the energy balance of pink shrimp, *Penaeus notiales*. Comp. Biochem. Physiol., **104A** (1), 183-187.
- Rosas C., Bolongaro-Crevenna A., Sanchez A., **Gaxiola G.**, **Soto L.** y Escobar E. 1995. Role of digestive gland in the energetic metabolism of *Penaeus setiferus*. Biol. Bull., **189**, 168-174.
- Santos E.A., **Nery L.E.M.** y **Manzoni G.C.** 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnatus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda: Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. **89A** (3), 329-332.
- Santos E.A. y Keller R. **1993a**. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrates metabolism: current perspectives. Comp. Biochem. Physiol., **106A** (3), 405-411.
- Santos E.A. y Keller R. **1993b**. Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for a dual feedback control system. J. Comp. Physiol., **163B**, 374-379.
- Santos E.A., **Maia-Nery L.E.**, Keller R. y Goncalves A.A. 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. Physiol. Zool., **70** (4), 415-420.

- Sarojini R., Nagabhushanam R y Fingerman M. 1995. Dopaminergic and **enkephalinergic** involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Gen. Comp. Endocrinol., 97, 160-170.
- Sefiani M., Jan-Pier L.C. y Soyez D. 1996. Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus gland of the penaeid shrimp. Gen. Comp. Endocrinol., 103, 41-53.
- Schmitt A.S. C. y Santos E.A 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during **emersion**. Comp. Biochem. Physiol., 106A (2), 329-336.
- Shafir S., Tom M., Ovadia M. y Lubzens E. 1992. Protein, **vitellogenin**, and **vitellin** levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). Biol. Bull. 183, 394-400.
- Shin-Ichi T., Kanasawa A y Koshio S. 1988. Lipid metabolism in **destalked** prawn *Penaeus japonicus*: induced maturation and **acumulation** of lipids in the ovaries. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1115-1122.
- Siu-Ming C., Rankin S.N. y Keeley L.L. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. Biol. Bull., 175, 185-192.
- Smith V.J. y Söderhäll K. 1983. Induction of degradation and lysis of **haemocytes** in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in **vitro**. Cell Tissue Res., 233,295-303.
- Smith V.J. y Söderhäll K. 1991. A **comparison** of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol., 15, 251-261.
- Söderhäll K., Vey A y Ramstedt M. 1984. **Haemocyte** lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish haemocyte. Dev. comp. Immunol., 8, 23-29.
- Söderhäll K. y Smith V.J. 1984. The prophenoloxidase system - a complement like pathway in arthropods?. pp.160-167. En: Infection processes of **fungi**. (D.W. Roberts y J.R. Aist eds). Rockefeller Foundation. NY., USA
- Söderhäll K., Smith V.J. y Johansson M.W. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte population of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defense reactions of arthropods. Cell Tissue Res., 245, 43-49.
- Söderhäll K. y Smith V.J. 1986. The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. pp. 208-223. En: Immunity in Invertebrates. (M. Brehelin ed). Springer Verlag, Berlin.

- Spaargaren D.H. y **Heafner** P.A. Jr. 1994. Interaction of ovary and hepatopancreas during the reproductive cycle of *Crangon crangon* (L). II Biochemical relationships. J. Crust Biol., 14 (1), 6-19.
- Steel R.G.D. y Tome J.H. 1997. **Biometadística: principios y procedimientos**. Segunda edición McGraw-Hill. Mexico. 622 p.
- Stryer L. 1988. Biochemistry. W.H. Freeman ed. NY., USA. **875p**.
- Telford M. 1975. Blood glucose in crayfish-111. The source of glucose and role of the **eyestalk** factor in hyperglycemia of *Cambarus* robustus. Comp. Biochem. Physiol., 51B, 69-73.
- Vafopoulou X. y Steel C.G.H. 1995. **Vitellogenesis** in the terrestrial isopod, *Osimus asellus* (L) Characterization of vitellin and **vitellogenins** and changes in their synthesis throughout the intermolt cycle. Invert. **Reprod. Dev.**, 18 (2), 87-95.
- Van-Aardt W.J. y Wolmarans C.T. 1987. Effect of anoxia on the haemolymph physiology and lactate concentration in the freshwater crab *Potamon warreni* Calman. Comp. Biochem. Physiol., 88A (4), **671-675**.
- Van-Herp F. 1992. Inhibiting and stimulating neuropeptides controlling reproduction in crustacea. Invert. **Reprod. Dev.**, 22 (1-3), 21-30.
- Vargas-Albores F. 1995. Sistema de defensa del **camarón café** (*Penaeus californiensis*). Ciencia, 46, 33-45.
- Vargas-Albores F., **Guzmán-Murillo-M.A.** y Ochoa J.L. 1993. Anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies in penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comp. Biochem. Physiol., **106A**, 299-303.
- Warr** G.W. 1981. Immunity in invertebrate. J. Inver. Pathol., **38**, 311-314.
- Webster S.G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. J. Exp. Biol., 199, 1579 - **1585**.
- Wilder M.N. y **Aida** K. 1995. Crustacean ecdysteroids and **juvenoids**: chemistry and physiological roles in two species of prawn, *Macrobrachium rosenbergii* and *Penaeus japonicus*. Israeli J. Aquaculture, 47 (3-4), **129-136**.