

Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos

Carlos Rosas, Cristina Pascual, Nelda López y Ariadna Sánchez

Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental
Facultad de Ciencias UNAM
Calle 26 No. 1 Playa Norte Cd. del Carmen, Campeche, México
Tel. (938) 38 287 30, E-mail: crv@hp.fciencias.unam.mx

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la industria del cultivo de camarón ha sido seriamente afectada por la diseminación de diversas enfermedades virales y bacterianas las cuales han provocado importantes pérdidas económicas (Alday-Sanz *et al.*, 1998; Lightner, 1999). De acuerdo con (Bachere, 2000) la presencia de enfermedades en los camarones esta íntimamente ligada con su condición fisiológica la cual a su vez depende de las condiciones ambientales. Estudios recientes han demostrado que muchos de los problemas bacterianos y virales de la industria camaronícola han sido consecuencia del deterioro ambiental producido por el crecimiento desmedido de la propia industria. La destrucción de importantes áreas de manglares en la zona costera tropical así como el uso indiscriminado de grandes cantidades de alimentos balanceados con altos niveles de proteína, el aumento de la densidad de siembra y el aporte de la materia orgánica que esto conlleva han sido identificados como los principales responsables de ese deterioro (Primavera, 1997; Kautsky *et al.*, 2000). Aunque la industria ha impulsado el uso de dispositivos que ayudan a mitigar el estrés ambiental (aumento de los niveles de oxígeno disuelto, aumento en la tasa de recambio, uso de aditivos nutricionales como inmunoestimulantes y antibióticos) estos no han sido suficientemente efectivos como para evitar la presencia recurrente de todo tipo de enfermedades. Ante tal situación numerosos autores han señalado que una de las alternativas para poder constituir una industria camaronícola de largo plazo esta en la reducción de las densidades de siembra, la creación de grandes áreas de amortiguamiento que prevengan la dispersión de enfermedades y la diversificación de los cultivos, adaptando las granjas a la capacidad de carga de los ecosistemas donde se desarrollan (para revisión véase (Kautsky *et al.*, 2000). Por otro lado el estudio de los factores del medio que producen estrés en los camarones y su relación con las variaciones naturales de los factores ambientales y nutricionales también han sido considerados como necesarios para poder establecer una industria camaronícola basada en la prevención de enfermedades (Bachere, 2000; Chang *et al.*, 2000; Rodríguez & LeMoullac, 2000).

En condiciones naturales los camarones son dependientes de las presas animales, incluyendo moluscos, otros crustáceos y pequeños invertebrados que abastecen de los amino ácidos esenciales, ácidos grasos, pigmentos y colesterol que aseguran su crecimiento

Rosas, C., Pascual, C., López, N., Sánchez, A., 2002. Metabolitos sanguíneos como herramientas para evaluar el estado nutricional de camarones peneidos. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

y reproducción (Ceccaldi, 1998). Partiendo de este principio, los alimentos balanceados han sido diseñados con el fin de cubrir con los requerimientos nutricionales de los camarones en un intento por mantener a los animales de tal forma que puedan crecer a las tasas máximas y además tolerar las presiones normalmente presentes en los estanques de cultivo. Tomando en cuenta esto, la industria se ha centrado principalmente en el mejoramiento de los alimentos balanceados con el fin de cubrir cada vez mejor los requerimientos nutricionales de los animales cultivados. Como parte de esta estrategia, se han modificado los niveles de vitaminas, minerales, pigmentos y se han incluido diversos tipos de aditivos (β glucanos, macroalgas, antibióticos, etc.) en un intento por mejorar el estado nutricional de los camarones y así aumentar la tolerancia a las enfermedades (Kontara *et al.*, 1995; Merchie *et al.*, 1998; Meyers & Latscha, 1997).

Uno de los problemas con los que se ha enfrentado la industria ha sido con la falta de criterios para la evaluación de la condición nutricional y/o de salud de los animales en cultivo. Actualmente muchas de las decisiones que implican el uso de uno u otro aditivo o estrategia de manejo ha estado basada en observaciones gruesas relacionadas con el consumo de alimento (disminución del consumo de alimento en las charolas de control), algunas características morfológicas (aparición de patas rojas, telson rojo) o los análisis bacteriológicos o virológicos que se llevan a cabo en las mismas granjas de cultivo. Desafortunadamente con ninguno de estos métodos es posible establecer con rapidez el estado nutricional y/o de salud de los animales lo que conlleva a la implementación de decisiones equivocadas o a la aplicación de acciones a destiempo: cuánto tiempo pasa entre que los animales dejan de comer y esto es detectado por el personal técnico de la granja? Cual es la relación entre cambios ambientales y patas o telson rojo? ¿Cuánto tiempo pasa desde que se toma una muestra y se obtienen los resultados de un análisis virológico o bacteriológico? Si se toma en cuenta que podrían pasar entre dos y tres días para que se pueda obtener información de la tasa de consumo de alimento en charolas, que se tiene poco conocimiento acerca de la relación entre los cambios de la pigmentación y los factores ambientales y que los análisis bacteriológicos y virológicos también requieren de varios días para dar un resultado, es posible darse cuenta que hace falta implementar estrategias de diagnóstico más rápido que permitan adelantarse a los problemas y que sirvan como una primera base para la toma de decisiones a tiempo.

En este sentido diversos grupos de investigación en varias partes del mundo se han dedicado a la búsqueda de indicadores del estado nutricional e inmunológico en aras de poder tener herramientas de diagnóstico. En este sentido destacan los trabajos llevados a cabo por (Palacios *et al.*, 1998; Palacios *et al.*, 1999a; Palacios, 2000; Palacios *et al.*, 1999b) en relación con la fatiga reproductiva de adultos reproductores de *L. vannamei*, el trabajo de Rodríguez *et al.*, (2000) en donde se analizaron los efectos del tipo de dieta en la respuesta inmune de juveniles de esta misma especie y los estudios realizados por Lignot *et al.* (1997), Lignot *et al.* (1999), Lignot *et al.* (2000) utilizando a la presión osmótica como indicador del estado nutricional de diversas especies de camarón. Al mismo tiempo en nuestro Laboratorio se han venido utilizando algunos metabolitos sanguíneos (glucosa, colesterol, acilglicéridos, proteínas y lactato), el glucógeno de la glándula digestiva, los niveles de oxi hemocianina (OxyHc), la presión osmótica y la respuesta inmune (actividad

de la profenol oxidasa, concentración y diferenciación de células sanguíneas) como indicadores del estado de la salud reproductiva de machos adultos de *L. setiferus* (Sánchez *et al.*, 2001) y para determinar el funcionamiento del metabolismo de los carbohidratos de juveniles de *L. vannamei*, *L. stylirostris* y *L. setiferus* alimentados con diferentes tipos de alimentos (Rosas *et al.*, 2000; Rosas *et al.*, 2001a; Rosas *et al.*, 2001b; Rosas *et al.*, 2002).

A pesar del cúmulo de información los resultados de laboratorio no pueden ser aplicados directamente a las granjas debido a que, por un lado, los organismos cultivados frecuentemente experimentan condiciones muy diferentes a las que experimentan los animales del laboratorio (Anderson *et al.*, 1987) y por el otro a la falta de valores de referencia que permitan establecer con alguna certeza la variación normal de los parámetros fisiológicos e inmunológicos en los camarones. Por esta razón en los últimos tres años nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a establecer las variaciones de algunos de los parámetros sanguíneos de *L. vannamei* con el objeto de conformar una línea base que sirva como una referencia tanto para animales cultivados como para realizar comparaciones entre grupos de investigación. La aplicación de los valores de referencia en el diagnóstico de camarones cultivados en una granja comercial también es presentada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de los organismos y tamaño de la muestra.

Los juveniles de *L. vannamei* utilizados en el presente estudio fueron donados por Industrias Pecis (Yucatán, México) en el mes de junio del año 2000. Se utilizaron juveniles de entre 0.5 y 1.2 g de peso los cuales fueron colocados en estanques externos de 20 m² con agua de mar natural, aireación constante y una densidad de 800 camarones/tanque (40 camarones/m²). El agua de mar de los tanques fue inoculada con la microalga *Tetraselmis chuii* (200 L/estanque; 800,000 cel/mL) antes de introducir a los camarones. Los camarones fueron alimentados con un alimento comercial con 45% de proteínas (Api camarón ultra Malta Clayton[®], México). Cuando los camarones alcanzaron los 2 g de peso un grupo de 400 camarones fue transportado al laboratorio y distribuidos en 40 tanques de plástico de (0.22 m²) a una densidad de 10 camarones/tanque. A estos tanques se les llamó “tanques experimentales”. Los animales se mantuvieron en estas condiciones durante 40 días, con aireación constante y un flujo de agua de mar natural filtrada (20 µm) el cual permitió un recambio del 100% diario (Fig. 1). Un grupo de 2400 camarones fueron colocados en tres estanques externos en donde se mantuvieron por 110 días entre julio y octubre del año 2000 (Fig. 1). Durante este tiempo la temperatura varió entre 27 y 29°C, el oxígeno disuelto se mantuvo por arriba de 5 mg/L, el pH > 8.0 y la salinidad entre 32 y 36‰. La mayor diferencia entre los tanques externos y los tanques experimentales fue la alimentación. Los animales mantenidos en los tanques externos tuvieron acceso al alimento vivo además del alimento con 35% de proteínas (Api camarón ultra Malta Clayton[®], México) el cual se suministró a razón del 5% del peso corporal por día. En los tanques experimentales los camarones tuvieron acceso únicamente al alimento peletizado el cual se suministró a razón del 15% de la biomasa por día. En ambos casos los camarones se alimentaron dos veces al día a las 0800 y 2000 h.



Fig. 1. Tanques experimentales (90L) y externos (20m²) utilizados para el mantenimiento de juveniles de *L. vannamei* durante 40 y 110 días, respectivamente.

Muestreo y análisis de la hemolinfa

Doce horas antes del muestreo se suspendió la alimentación de ambos grupos de camarones con el fin de evitar la interferencia del alimento en los parámetros sanguíneos medidos. Una vez transcurrido ese lapso grupos de 5 camarones fueron colocados por 5 minutos en recipientes plásticos de 4 L con agua de mar pre aireada y enfriada a 18°C. Estudios previos demostraron que con este procedimiento es posible reducir efectivamente el estrés de los animales producido por la captura sin afectar los valores de los metabolitos sanguíneos medidos en este y otros estudios (Rosas *et al.*, 2000) (Fig. 2).



Fig. 2. Recipiente plástico utilizado para transportar a los organismos desde los tanques experimentales al laboratorio previo la extracción de la hemolinfa.

Para tomar la muestra los camarones fueron suavemente extraídos del recipiente de aclimatación y colocados en una toalla secante con el fin de eliminar el agua en exceso. Posteriormente una muestra de entre 200 y 300 μ L por camarón fue obtenida utilizando una jeringa insertada en la base del quinto par de pereiópodos evitando que la muestra de sangre se mezclara con el aire durante la succión con la jeringa (Fig. 3).



Figura 3. Extracción de una muestra de hemolinfa de 150 μl a un juvenil de *L. vannamei*

La muestra de sangre fue colocada suavemente sobre un parafilm colocado sobre una placa fría. De la gota de sangre así obtenida se tomaron submuestras las cuales fueron utilizadas para la determinación de los diferentes metabolitos sanguíneos analizados. En el presente estudio únicamente organismos en estadio C de muda fueron considerados para el análisis. Para la identificación del estadio de muda se utilizaron los criterios de observados a través del crecimiento de las setas de los urópodos (Drach & Tchernigovtzeff, 1967). Para medir la hemocianina (oxyHc) 10 μL de hemolinfa fueron inmediatamente diluidos con 990 μL de agua destilada en una cubeta para UV de 10 mm (1.0 ml, 1 cm de espesor) en donde se midió la absorbancia a 335 nm. La concentración de oxyHc se determinó utilizando un coeficiente de extinción de $E = 17.26$ calculado en base a una sub unidad de 74000 Da para camarones (Chen and Cheng, 1993). Simultáneamente 20 μL de sangre fueron tomados para medir la presión osmótica utilizando un micro osmómetro (American Advanced Instruments). Los metabolitos sanguíneos se determinaron en plasma el cual fue obtenido de sangre diluida con anticoagulante frío (8°C; 1:2 sange:Anticuagulante). La solución salina fue preparada de acuerdo a Vargas-Albores *et al.*, (1993) (450 mM NaCl, 10 mM KCL, 10 mM EDTA- Na_2 , 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm kg^{-1}). La hemolinfa más anticoagulante fue centrifugada a 800 g por 3 min y el sobrenadante fue separado para la evaluación de la concentración de los metabolitos. Se utilizaron kits comerciales para la determinación de la glucosa, acilglicéridos, colesterol, lactato y proteínas. Estas determinaciones fueron hechas en 20 μL de plasma la cual se mezcló con 200 μL del reactivo en los pozos de una microplaca. La absorbancia fue registrada en un lector de micro placas (BIO-RAD modelo 550) y la concentración del metabolito fue calculada usando una curva de calibración. Las proteínas fueron determinadas en plasma diluido (1:300) utilizando la técnica de Bradford, (1976) y albúmina bovina como estándar.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Un análisis descriptivo fue usado para caracterizar los datos de cada metabolito en ambos grupos de camarones. Una prueba de Chi cuadrada fue aplicada para establecer si los valores de las muestras de sangre tenían una distribución normal. Cuando H_0 fue aceptada

(la población muestreada tiene una distribución normal) los resultados fueron expresados como promedio $\pm s$. Cuando H_0 fue rechazada, los resultados fueron expresados como mediana \pm un rango de cuartiles. Cuando los datos tuvieron distribución normal la comparación de los metabolitos entre los grupos de camarones (entre tanques experimentales y externos) la comparación fue hecha utilizando una prueba de t de Student. Cuando los datos no tuvieron una distribución normal esta comparación se realizó usando una prueba de muestras pareadas de Wilcoxon (Zar, 1974). Cuando no se detectaron diferencias entre grupos, los datos fueron agrupados y los parámetros estadísticos nuevamente calculados y analizada la normalidad de la distribución de los datos. Una línea base de estos valores fue obtenida utilizando los promedios o las medianas la cual fue comparada con datos de la literatura usando los valores promedio $\pm s$ ó mediana \pm rango de cuartiles como intervalo de confianza para cada metabolito sanguíneo (Zar, 1974). Esta línea base fue comparada con datos obtenidos de la literatura y reportados para *L. vannamei* por Racotta & Palacios, (1998), Rosas *et al.*, (2002) Rosas *et al.*, (2000) Rosas *et al.*, (2001a) y Rodríguez *et al.*, (2000). Así la distribución de frecuencias y los descriptores estadísticos fueron calculados para el total de los datos obtenidos de los parámetros sanguíneos utilizados. Tomando en cuenta el número de datos de cada metabolito, se consideró que estos datos podrían representar los niveles poblacionales representantes de *L. vannamei* cultivados y así fueron clasificados.

RESULTADOS

Los animales ahora utilizados fueron mantenidos en condiciones de laboratorio y de estanques externos en donde fueron alimentados con dietas prácticas que cubren los requerimientos nutricionales adecuadamente (35% de proteína, 20% CBH, 11% de lípidos). En todos los casos los metabolitos fueron medidos en condiciones estandarizadas, lo cual garantizó la baja dispersión y así la confiabilidad de los valores obtenidos. El nivel de proteínas dietéticas de los 211 camarones mantenidos en condiciones de laboratorio presentaron una distribución normal (Fig. 4). Un valor promedio de 93 ± 17 mg/ml fue considerado para esta población de organismos.

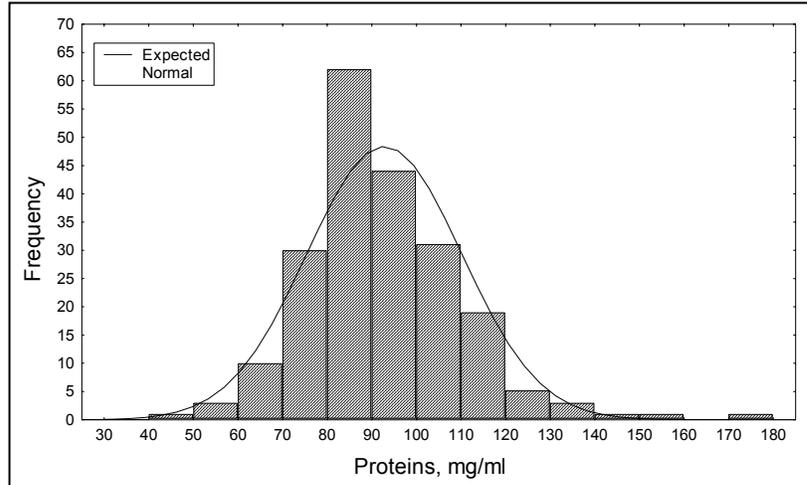


Fig. 4. Distribución de frecuencias de las proteínas plasmáticas en juveniles de *L. vannamei*. N= 211.

Este valor es similar al reportado por Racotta & Palacios, (1998) (100 mg/ml) y por Rodriguez *et al.*, (2000) (127 mg/ml) para juveniles de *L. vannamei* alimentados con dietas convencionales con 35 % de proteína y mantenidos en tanques experimentales en el laboratorio. Los niveles de proteína sanguínea de animales mantenidos en estanques externos simulando condiciones de cultivo no mostraron una distribución normal, poniendo en evidencia que en los animales de estanques de cultivo el alimento puede jugar un papel importante en los niveles de los metabolitos sanguíneos (Fig. 5).

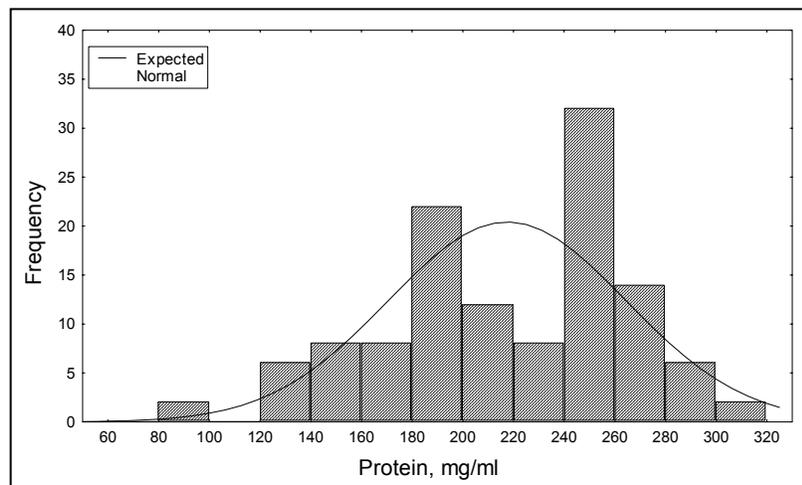


Fig. 5. Distribución de frecuencias de las proteínas plasmáticas en juveniles de *L. vannamei*. N= 379.

Un valor mediano de 224 ± 64 mg/ml de proteínas para animales mantenidos en estanques externos fue calculado. Este valor resultó ser 57% mayor que el obtenido de animales mantenidos en condiciones de laboratorio indicando el efecto que puede producir la alimentación permanente en los metabolitos sanguíneos.

De ambos grupos de datos se calculó una distribución de frecuencias poblacional con los descriptores estadísticos convencionales. La distribución de estos datos no mostró una distribución normal poniendo en evidencia la manera en la población de datos, según el origen de los organismos es separable (Fig. 6). De estos cálculos un valor mediano para la población de *L. vannamei* puede ser propuesto de 152 ± 81 mg/ml en el cual se incluyen a las poblaciones de camarones mantenidas en condiciones de laboratorio como aquellas mantenidas en estanques externos simulando cultivos comerciales.

Los niveles de hemocyanina (Hc) de los camarones mantenidos en condiciones de laboratorio presentaron una distribución normal. Un valor promedio de 1.88 ± 0.34 mmol/l fue obtenido de este grupo de animales. De manera similar un valor de 1.84 ± 0.46 mmol/l fue calculado de los animales mantenidos en estanques externos, evidenciando que la Hc no fue afectada por las condiciones de cultivo. De estos datos se construyó una distribución de frecuencias la cual permitió calcular y valor promedio poblacional ($N= 714$) de 1.85 ± 0.42 mmol/l (Fig. 7).

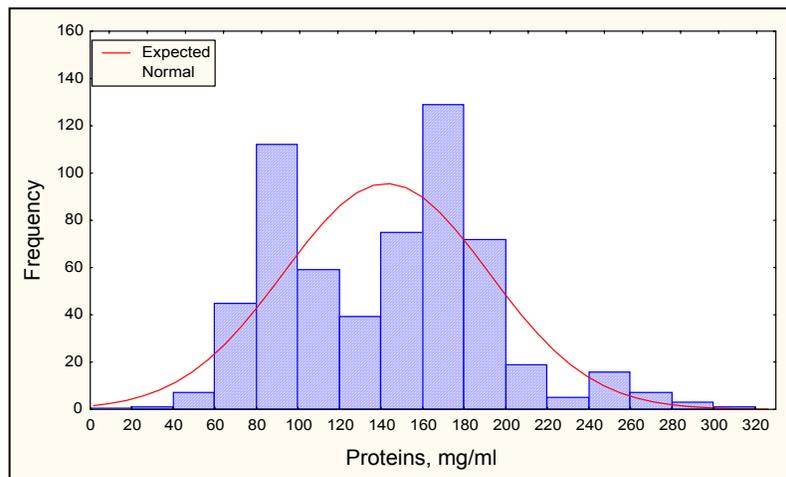


Fig. 6. Distribución de frecuencias de las proteínas plasmáticas en juveniles de *L.vannamei*. $N=590$.

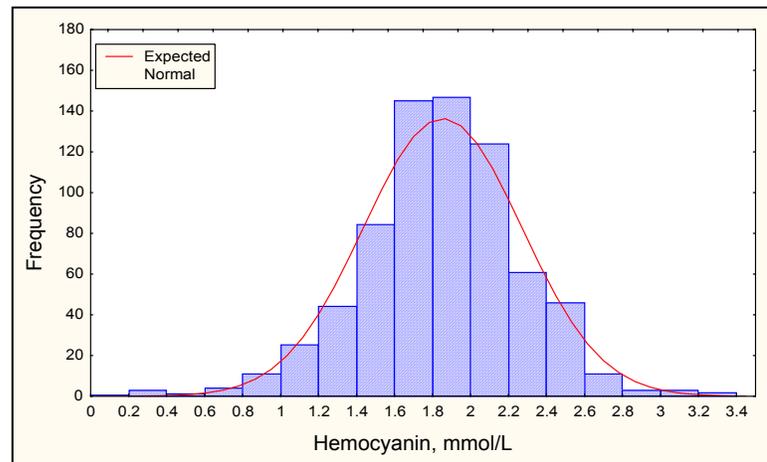


Fig. 7. Distribución de frecuencias de los niveles de hemocianina en juveniles de *L.vannamei*. N=714.

Estos valores resultaron mayores que los observados por Racotta & Hernández-Herrera, (2000) (1.35 ± 0.04 mmol/l) y similares a los obtenidos por Rosas *et al.*, (2002) (1.51 ± 0.08 mmol/l), ambos obtenidos en animales mantenidos en condiciones experimentales de laboratorio.

Los niveles de glucosa en sangre tanto de la población de camarones mantenidos en condiciones de laboratorio como en estanques externos no presentaron una distribución normal. Los valores medianos calculados fueron de 0.28 ± 0.18 mg/ml y 0.38 ± 0.21 mg/ml, condiciones de laboratorio y estanques externos, respectivamente. Dado que no se encontraron diferencias significativas entre condiciones de mantenimiento un valor de 0.33 ± 0.2 mg/ml puede ser propuesto como valor de referencia para juveniles de *L. vannamei* (Fig. 8).

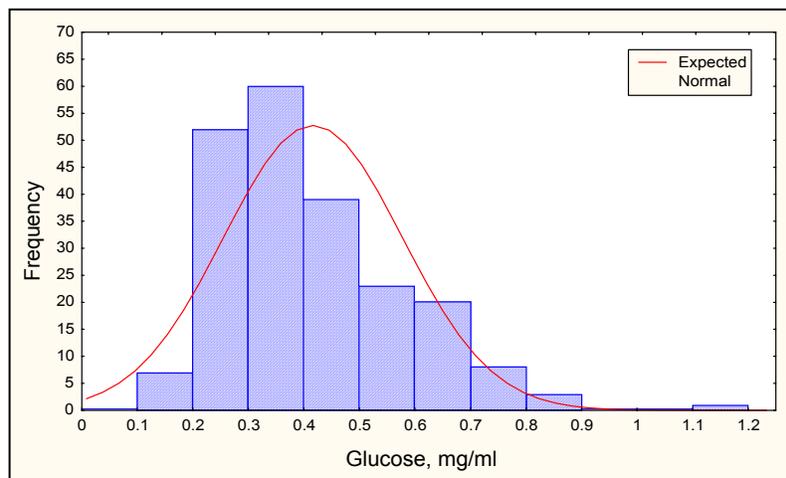


Fig. 8. Distribución de frecuencias de los niveles de glucosa en plasma en juveniles de *L.vannamei*. N=380.

Este valor promedio resultó 2 veces mayor que el valor obtenido por Racotta & Palacios, (1998) de 0.15mg/ml y similar al reportado en Rosas *et al.*, (2001^a), Rosas *et al.*, (2001c) y Rosas *et al.*, (2001b). Es interesante hacer notar que animales estresados Racotta & Palacios, (1998) presentaron valores más altos (0.58 mg/ml) al propuesto como referencia indicando la utilidad de este para establecer condiciones normales para juveniles de *L. vannamei*.

El lactato en sangre no mostró una distribución normal ni deferencias significativas entre condiciones (Fig. 9). Así un valor mediano de 0.11 ± 0.10 mg/ml puede ser propuesto como referencia para juveniles de *L. vannamei*.

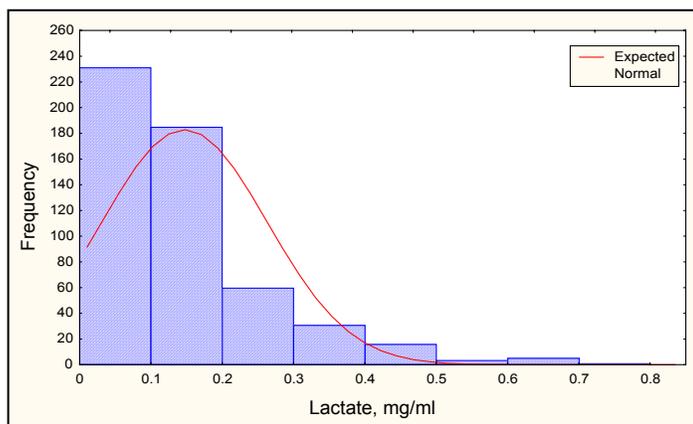


Fig. 9. Distribución de frecuencias de los niveles de Lactato en plasma en juveniles de *L. vannamei*. N=532.

Estos valores resultaron mayores a los obtenidos como línea base por Racotta & Palacios, (1998) (0.015 mg/ml) y menores a los valores obtenidos de camarones estresados y reportados en ese mismo trabajo (0.3 mg/ml). En el límite superior del intervalo de cuartiles del valor de referencia fue localizado el valor reportado por Rosas *et al.*, (2000) para animales sometidos a un estrés salino.

Los niveles de acilglicéridos sanguíneos en los camarones estudiados no mostraron distribución normal ni en los animales mantenidos en tanques experimentales como en estanques externos. Un nivel mediano significativamente más alto fue registrado en los camarones mantenidos en condiciones de laboratorio (1.34 ± 0.70 mg/ml) que el observado en animales mantenidos en estanques externos (1.04 ± 0.63 mg/ml) (Fig. 10). Ambos valores resultaron superiores a los observados por (Racotta and Palacios, 1998) (0.4 mg/ml) y por Rosas *et al.* (2000) en juveniles de esta misma especie.

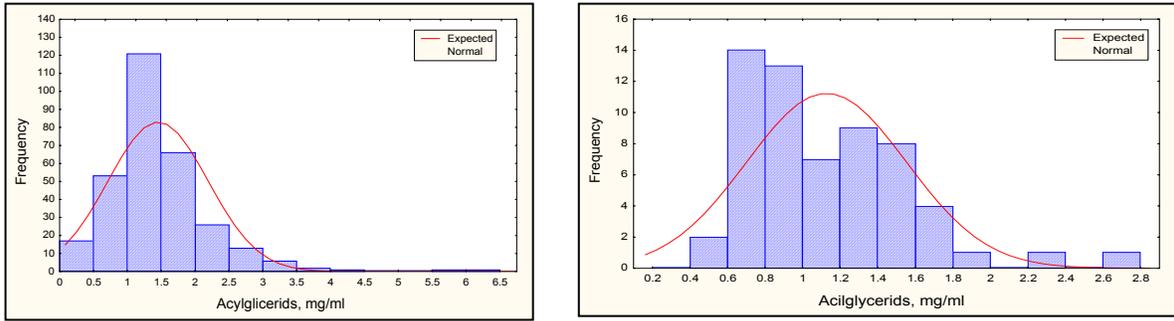


Fig. 10. Distribución de frecuencias de los niveles de acilglicéridos en plasma en juveniles de *L.vannamei*. N=367. La figura de la izquierda indica animales mantenidos en condiciones de laboratorio y la de la derecha animales mantenidos en estanques externos.

El colesterol sanguíneo no mostró una distribución normal ni en los mantenidos en estanques experimentales ni en los mantenidos en estanques externos (Fig. 11). Al igual que con los acilglicéridos los niveles de colesterol mostraron diferencias significativas entre condiciones de mantenimiento con los valores más altos en los animales mantenidos en estanques experimentales (1.06 ± 0.52 mg/ml) y los menores en los animales mantenidos en estanques externos (0.44 ± 0.21 mg/ml) (Fig. 11).

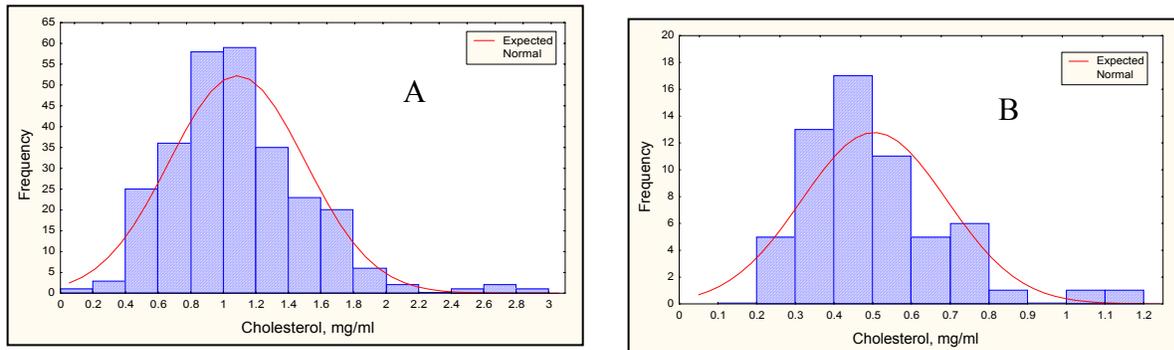


Fig. 11. Distribución de frecuencias de los niveles de colesterol en plasma de los juveniles de *L. vannamei* mantenidos en condiciones experimentales (A; N = 273) y en estanques externos (B; N= 60).

El glucógeno de la glándula digestiva no mostró una distribución normal (Fig.12. No se observaron diferencias significativas entre condiciones de cultivo así que un valor mediano de 2.69 ± 2.64 mg/ml puede ser utilizado como referencia para juveniles de *L. vannamei* (Fig. 12).

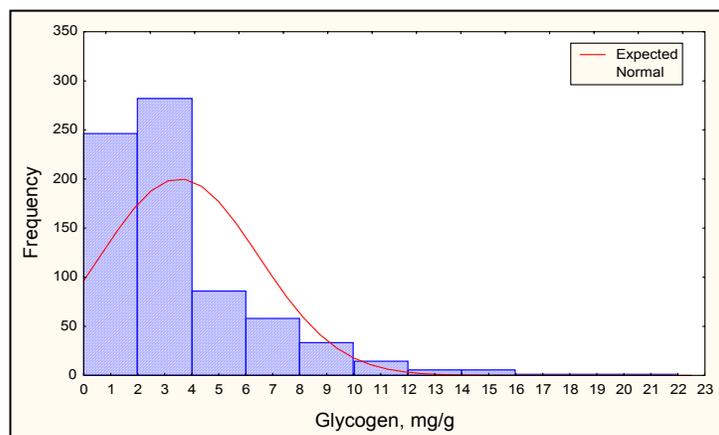


Fig. 12. Distribución de frecuencias de los valores de glucógeno de la glándula digestiva de juveniles de *L. vannamei* cultivados en condiciones de laboratorio y en estanques externos. N= 736.

DISCUSIÓN

El presente estudio pone en evidencia que no todos los metabolitos sanguíneos y moléculas estudiadas en los juveniles de *L. vannamei* tienen una distribución normal. De hecho únicamente la hemocianina y las proteínas de los animales cultivados en tanques experimentales fueron normalmente distribuidas. Todos los demás parámetros medidos presentaron distribuciones cargadas hacia la izquierda.

Las diferencias en los niveles de proteínas, acilglicéridos y colesterol entre animales cultivados en condiciones experimentales y estanques externos son un reflejo de las condiciones nutricionales que son ofrecidas en estanques (alimento vivo más alimento peletizado) y laboratorio (alimento peletizado). En los estanques externos se observó que la una mayor dispersión de valores en la distribución de frecuencias indicando la mayor variabilidad en los metabolitos en estos animales en comparación con el comportamiento de los datos observado en los animales mantenidos en condiciones de laboratorio. Estas diferencias pueden ser interpretadas en el sentido del efecto que la disponibilidad de alimento tiene en los niveles sanguíneos de estos metabolitos.

Uno de los pre-requisitos para la evaluación de los metabolitos sanguíneos en animales experimentales es que estos permanezcan en ayuno por lo menos 12 horas antes de realizar las mediciones. Esto se ha establecido así con el fin de evitar la interferencia que el alimento recién consumido provoca en los niveles sanguíneos de éstos. Cuando este procedimiento es seguido con rigor es común observar valores poco dispersos, los cuales son un reflejo de la condición nutricional experimental a la que han sido expuestos los organismos. Así, los resultados obtenidos ahora en condiciones de laboratorio y dado el número de datos obtenido son una buena base para ser considerada como referencia de las macromoléculas que son indiciadoras del estado nutricional de juveniles de *L. vannamei* cultivados en condiciones de laboratorio y alimentados con dietas que cubren adecuadamente el requerimiento nutricional.

Cuando la tasa de ingestión de alimento no puede ser controlada (como es el caso de los animales de estanques externos) los valores de los metabolitos sanguíneos tienden a ser mucho más dispersos, evidenciando la variabilidad asociada con la ingestión prácticamente constante de alimento por parte de la población de camarones cultivada en el estanque. No obstante esto y tomando en cuenta la cantidad de datos obtenidos ahora es posible prever que los valores de referencia propuestos ahora difícilmente se alejarán mucho de los valores que puedan obtenerse en granjas de cultivo comercial.

Por ejemplo. En fechas recientes (abril del año 2002) se realizó un muestreo en una granja de cultivo de *L. vannamei* la cual cultivaba animales en 40 ups y suministraba un alimento balanceado comercial con 25% de proteína ya que mantenía a los animales en baja densidad (8 animales/m²) y en un estanque de 65 Has. Los resultados obtenidos del análisis de 100 camarones (Tabla 2) muestran valores de los metabolitos sanguíneos que se encuentran dentro del rango de distribución de los valores observados en la población de camarones de los estanques externos obtenidos en el presente estudio.

Tabla 2. Variaciones de los niveles de diferentes metabolitos en plasma en juveniles de *L. vannamei* de una granja comercial localizada en el Sur del Estado de Sinaloa. Valores dados como promedio \pm E.S. C y D indican el estadio de muda de los ejemplares analizados.

Peso	Glucosa mg/ml	Acilglicéridos mg/ml	Colesterol mg/ml	Proteínas mg/ml	Hemocianina Mmol/l
<u>Valores de referencia</u>	0.38	1.04	0.44	224	1.84
3.86 \pm 0.10 (C): N = 68	0.66 \pm 0.02	0.52 \pm 0.02	0.57 \pm 0.02	168 \pm 4	1.65 \pm 0.03
4.03 \pm 0.07 (D): N = 32	0.63 \pm 0.01	0.65 \pm 0.01	0.83 \pm 0.06	188 \pm 6	1.73 \pm 0.02

Como se puede apreciar los valores de acilglicéridos, proteínas y hemocianina resultaron ser menores que los obtenidos en animales cultivados en estanques externos, mientras que los valores de glucosa y colesterol mostraron valores mayores a los de referencia obtenidos en el presente estudio. Aunque una explicación de las diferencias observadas entre ambos estudios puede ser obtenida, un registro de diversos muestreos de este tipo a lo largo del ciclo de cultivo permitirá establecer con mucha mayor precisión la forma en que el alimento vivo en combinación con el alimento balanceado determina el estado nutricional de los camarones cultivados. No obstante y de acuerdo con los valores de referencia aquí obtenidos un diagnóstico general puede ser dado para resultados de esta naturaleza:

“Los metabolitos sanguíneos indican que los camarones en el estanque estaban sub alimentados ya que los niveles de acilglicéridos resultaron ser estadísticamente menores (50%) a los observados en los organismos de referencia. Así mismo se observó que los niveles de proteínas y hemocianina también están por debajo de los valores de referencia aunque en este caso los valores se ubicaron muy cerca del límite inferior del intervalo de seguridad establecido en ± 1 desviación estándar. Una evidencia de que los camarones pudieran estar sub alimentados, además esta en el hecho de que los valores de glucosa se ubicaron muy por encima de los niveles normales (65% mayor), indicando que los camarones pudieran estar ingiriendo grandes cantidades de materia orgánica de origen

bacteriano como complemento a la falta de alimento balanceado. Las diferencias observadas entre los dos estadios de muda son normales. Una menor concentración de acilglicéridos indica una mayor movilización hacia la epidermis, mientras que un aumento en colesterol indica una mayor necesidad de este nutriente para la conformación de la hormona de la muda. El mayor nivel de proteínas y hemocianina indica una movilización de proteínas desde los sitios de reserva acopladas con la síntesis de tejido nuevo para el crecimiento. Este comportamiento indica que los animales están sanos y movilizan adecuadamente los nutrientes durante la muda”.

Para evitar que esta dispersión distorsione la calidad de los resultados obtenidos en estas poblaciones es necesario que cada ciclo de cultivo se realice monitoreos de la condición nutricional de los camarones cultivados en cada estanque y durante el mayor tiempo posible, intentando establecer patrones de referencia propios y de acuerdo con las características peculiares de cada granja. Con estos procedimientos a la vuelta de uno o dos ciclos se podrá tener una herramienta muy poderosa y de diagnóstico rápido que ayude a establecer el estado nutricional de los camarones en cultivo que, en última instancia, es el que determina el estado general de salud de los animales (Bachere, 2000)

Las diferencias entre estanques internos y externos son debidas al alimento disponible para los camarones. En las granjas muchos productores reconocen los beneficios que tiene para el cultivo el promover la producción primaria y secundaria como una fuente adicional de alimento para los camarones, los cuales han sido cuantificados experimentalmente. Anderson *et al.*, (1987) reportaron que entre el 53 y 77% del crecimiento de juveniles de *L. vannamei* es debido a la asimilación natural de la biota presente en el estanque. En otros estudio se demostró que *L. vannamei* crece mucho mejor cuando es cultivado en estanques con materia orgánica que en estanques mantenidos con agua clara (Leber & Pruder, 1988). De acuerdo con Otoshi *et al.*, (2001), el crecimiento de los camarones puede ser mejorado cuando los camarones son cultivados con agua que contiene bacterias, micro algas y detritus ya que estos agregados proporcionan proteínas y vitaminas extras a los animales en cultivo. Además de los beneficios directos, estudios recientes han demostrado que el alimento vivo aumenta la actividad de las enzimas digestivas aumentando la asimilación del alimento (Guzmán *et al.*, 2001), lo cual al final afecta la asimilación del alimento y por ende los metabolitos sanguíneos. Así los resultados obtenidos ahora en condiciones de laboratorio en aguas claras son evidentemente limitados a la realización de comparaciones entre condiciones experimentales ya que estas condiciones difieren significativamente de las que los camarones experimentan en estanques de cultivo los cuales afectan la fisiología de los organismos de manera importante.

Sin embargo, no todos los metabolitos sanguíneos fueron mayores en los animales cultivados en estanques externos. Los acilglicéridos (AG) sanguíneos fueron mayores en los animales mantenidos en el laboratorio poniendo en evidencia los efectos que el alimento peletizado tiene en el metabolismo de lípidos de los camarones. Aunque el requerimiento de lípidos en juveniles de camarón es relativamente bajo (11%) y son éstos más importantes durante la vitelo génesis (Mourente *et al.*, 1994) las diferencias observadas en el presente estudio pudieran estar relacionadas con la cantidad de alimento que es dado a los camarones en los estanques externos (5% del peso corporal) en

comparación con el 15% suministrado en condiciones de laboratorio. Así estos resultados ponen también en evidencia que no siempre el alimento vivo de los estanques externos ofrecerá las mismas cantidades y la misma calidad de lípidos que se puede ofrecer en condiciones de laboratorio utilizando un alimento balanceado de calidad. De esta manera los valores de referencia ahora propuestos podrían ser útiles para calificar a los alimentos balanceados comerciales los cuales son elaborados con frecuencia con ingredientes de calidad variable.

Las proteínas sanguíneas mostraron diferencias significativas entre sistemas de cultivo con los valores menores en los animales mantenidos en los tanques experimentales y los mayores en los animales cultivados en estanques externos. Las proteínas son un nutriente esencial para los crustáceos en general y para los camarones peneidos en particular, dado que son básicas para el crecimiento (Andrews *et al.*, 1972; Djangmah, 1970), la regulación de la presión osmótica del medio interno (Charmantier *et al.*, 1994; Lignot *et al.*, 1999; Lignot *et al.*, 2000), la gluconeogénesis (Rosas *et al.*, 2001b; Rosas *et al.*, 2002) y el sistema inmune (Johansson *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2001; Sritunyalucksana & Söderhall, 2000). Por esa razón las variaciones de estas en la sangre pueden ser utilizadas como buenos indicadores del estado fisiológico general incluyendo el nutricional y el de salud. Estudios recientes han demostrado que la hemocianina (Hc) tiene un papel antimicótico (Destoumieux *et al.*, 2001). Al mismo tiempo se ha señalado que la hemocianina puede ser un almacén de proteínas por lo que se ha utilizado como indicador del estado nutricional (Rosas *et al.*, 2001b; Rosas *et al.*, 2002). Tomando en cuenta esta información y el hecho de que la Hc puede ser entre el 60 y el 90% de las proteínas de la sangre es evidente que la Hc junto con las proteínas proporcionan elementos que permiten evaluar el estado general de los camarones en cultivo ya que en estas se reflejan tanto la calidad del alimento como el estado del sistema inmune. Para tener un índice que tome en cuenta ambas variables metabólicas se ha utilizado con frecuencia la razón Hc/proteína (Chen *et al.*, 1994; Racotta & Hernández-Herrera, 2000). De los resultados obtenidos en el presente estudio es posible calcular la razón Hc/proteínas para camarones mantenidos en tanques experimentales (0.95) y para camarones cultivados en estanques externos (0.56). De estos resultados es evidente que la proporción de Hc en el total de proteínas sanguíneas es controlada por la calidad de la dieta la cual, en el caso de condiciones de laboratorio esta restringida al alimento peletizado suministrado. Estos resultados indican que en condiciones de laboratorios el metabolismo de proteínas podría estar más vinculado con el papel nutricional de la Hc que cuando los animales se encuentran en los estanques externos, donde nuevamente el alimento natural tuvo una influencia altamente positiva en la nutrición de los camarones.

La glucosa sanguínea es un indicador del metabolismo de carbohidratos (CHO) y del nivel de este nutriente en la dieta (Rosas *et al.*, 2001b; Rosas *et al.*, 2002). Así mismo se ha observado que los niveles de glucosa sanguínea suelen elevarse rápidamente cuando los camarones son sometidos a estrés, haciendo que este valor sea difícil de medir con precisión (Racotta & Palacios, 1998). Por esa razón para la realización del presente estudio se implementó un protocolo riguroso en el manejo de los organismos que permitiera la reducción del estrés producido por la captura y el transporte al laboratorio. Este protocolo fue elegido considerando que con éste se podían obtener valores similares en camarones

sometidos bajo las mismas condiciones, lo cual era un indicador de la reproducibilidad del método. Dado que en la mayoría de los estudios publicados no se especifica el procedimiento seguido para evitar el estrés de captura y transporte de los organismos al laboratorio antes de tomar la muestra de sangre los resultados obtenidos ahora con respecto a los niveles de glucosa sanguínea no son del todo comparables, aunque referencias a organismos estresados pueden ser útiles para saber si los niveles de glucosa obtenidos ahora representan a animales no estresados, tal y como fue el caso al realizar comparaciones con los resultados obtenidos por Racotta & Palacios (1998) en camarones estresados. Así de los resultados obtenidos ahora es evidente que la glucosa sanguínea puede ser altamente sensible a los niveles de CHO dietéticos y también ser útil para evaluar el nivel de estrés de los organismos durante el propio muestreo lo cual puede ser de gran ayuda para establecer la calidad de la información obtenida de diferentes muestreadores.

De acuerdo con Mourente *et al.*, (1994) los acilglicéridos (AG) son la mayor fuente de energía y representan la molécula de almacenamiento de esta en camarones. La concentración de AG es dependiente directamente del tipo de alimento. Se ha demostrado (Mourente *et al.*, 1994; Teshima, 1998) que la relación tan estrecha entre alimento y nivel de AG en sangre se debe a que, debido a lo limitado del espacio para almacenamiento de lípidos en la glándula digestiva estos deben de ser procesados rápidamente y almacenados en la sangre, donde son distribuidos a los diferentes tejidos para su aprovechamiento. Así, si la dieta utilizada es baja en lípidos o estos no son bio disponibles esto se verá reflejado en los niveles de AG sanguíneos lo que permitirá tomar decisiones y hacer diagnósticos rápidos sobre la calidad nutricional de ese alimento en particular. Dado que el colesterol no puede ser sintetizado por los camarones y este es almacenado también en la sangre, el colesterol al igual que los AG puede ser un indicador altamente valioso para conocer el estado nutricional de camarones cultivados y utilizar, los valores de referencia obtenidos ahora como elementos de comparación de animales mantenidos en condiciones nutricionalmente adecuadas.

El uso de los presentes resultados para elaborar diagnósticos en estanques de cultivo comercial es limitado a conocer las condiciones particulares de cada estanque y las variaciones naturales del alimento natural en cada caso particular. No obstante esta limitación, por el número de datos ofrecido, existe una alta probabilidad de que los datos obtenidos de metabolitos sanguíneos en camarones cultivados y bien nutridos se encuentren dentro del intervalo del promedio ± 1 DS ó mediana ± 1 Cuartil (según sea el caso) de los valores presentados ahora. Es interesante hacer notar que si los valores obtenidos en un estanque en particular no cae dentro de los intervalos propuestos, una revisión sobre las condiciones de cultivo, calidad del alimento ofrecido, frecuencia de alimentación etc., deberán ser realizados, con el fin de poder establecer si esas variaciones de los metabolitos son producto de un problema asociado con esas variables o es parte de una variación natural relacionada con las características propias del estanque.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con los fondos otorgados por la UNAM a través del programa Papiit dados a CR a través del proyecto IN 206199.

LITERATURA CITADA

- Alday-Sanz, V., Thaikua, S., Yousif, A. N., Albright, L. J., Flegel, T. W., 1998. Studies on IgY for passive immunization of shrimp against white spot syndrome virus. In: Flegel, T. W. (Ed.), *Advances in shrimp biotechnology*, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 141-143.
- Anderson, R. K., Parker, L. P., Lawrence, A., 1987. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by a commercial important shrimp *Penaeus vannamei* in pond growout system. *Journal of the World Aquaculture Society* 18, 148-155.
- Andrews, J. W., Sick, L. V., B. G. J., 1972. The influence of dietary proteins and energy levels on growth and survival of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 1, 341-347.
- Bachere, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191, 3-11.
- Bradford, M. M., 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Ceccaldi, H. J., 1998. A synopsis of morphology and physiology of digestive system of some crustacean species studied in France. *Reviews in Fisheries Science* 6, 13-19.
- Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S., Liao, I-C. 2000. Immunomodulation by dietary β 1-3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 505-514.
- Charmantier, G., Soyes, C., Aquacop, 1994. Effect of moult stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Ecol.* 178, 223-246.
- Chen, J. C., Cheng, S. Y., 1993. Studies in hemocyanin and hemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. *Comp. Biochem. Physiol. B* 106, 293-296.
- Chen, J. C., Cheng, S. Y., Chen, C. T., 1994. Changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 339-347.
- Destoumieux, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachere, E., 2001. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 47070-47077.
- Djangmah, J. S., 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comp. Biochem. Physiol.* 32, 709-731.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur le method de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Biologie Marine* 8, 595-610.
- Guzmán, C., Gaxiola, G., Rosas, C., Torre-Blanco, A., 2001. The effect of dietary protein and total energy content on the digestive enzyme activities, growth and survival of *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus 1767) postlarvae. *Aquaculture Nutrition* 7, 113-122.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhall, K., 2000. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tadengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191, 145-161.
- Kontara, E. K. M., Merchie, G., Lavens, P., Nelis, H., Leenheer, A., Sorgeloos, P. 1995. Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* through supplementation of L-ascorbyl-2-polyphosphate in the diet. *European Aquaculture Society Special Publication*. 24, 230-233.
- Leber, K. M., Pruder, G. D., 1988. Using experimental microcosms in shrimp research: the growth enhancing effect of shrimp pond water. *Journal of the World Aquaculture Society* 19, 197-203.
- Lightner, D. V., 1999. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: Current Status in the Americas, Available Diagnostic Methods, and Management Strategies. *Journal of Applied Aquaculture*, vol.9, no.2. 1999.

- Lignot, J. H., Charmantier, G., Trilles, J.P., 1997. Effects of an organophosphorous insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Biol.* 128, 307-316.
- Lignot, J. H., Cochard, J. C., Soyeux, C., Lemaire, P., Charmantier, G., 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 170, 79-92.
- Lignot, J. H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209-245.
- Merchie, G., Kontara, E. K. M., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K., Sogeloes, P., 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research* 29, 579-585.
- Meyers, S. P., Latscha, T., 1997. Carotenoids. In: D'Abramo, L.C.D.E.a.A.D.M. (Ed.), *Crustacean Nutrition*, 6, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 164-186.
- Mourente, G., Medina, A., González, S., Rodríguez, A., 1994. Changes in lipid class and fatty acid contents in the ovary and midgut gland of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodidae) during maturation. *Marine Biology* 121, 187-197.
- Otoshi, C. A., Montgomery, A.D., Look, A.M., Moss, S.M., 2001. Effects of diet and water source on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 32, 243-249.
- Palacios, E., 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, vol.185, no.3 4, 185, 353-371, 25.
- Palacios, E., Carreño, D., Rodríguez-Jaramillo, M. C., Racotta, I. S. Effect of Eyestalk Ablation on Maturation, Larval Performance, and Biochemistry of White Pacific Shrimp, *Penaeus vannamei*, Broodstock. *Journal of Applied Aquaculture*, vol.9, no.3.1999.
- Palacios, E., Ibarra, M. E., Ramírez, J. L., Portillo, G., E., R., 1998. Biochemical composition of egg and nauplii in white shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) in relation to physiological condition of spawners in a commercial hatchery. *Aquaculture Research* 29, 183-189.
- Palacios, E., Pérez-rostro, C. I., Ramírez, J. L., Ibarra, A. M., Racotta, I. S., 1999b. Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. *Aquaculture* 171, 309-321.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C., 2002. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* (in press).
- Primavera, J. H., 1997. Socioeconomic impacts of shrimp culture. *Aquaculture Research* 28, 815-827.
- Racotta, I. S., Hernández-Herrera, R., 2000. Metabolic response of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A, 437-443.
- Racotta, I. S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 351-356.
- Rodríguez, J., Cedeño, R., Molina, C., Otero, V., Valenzuela, V., Sotomayor, M. A., 2000. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. In: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M., Civera R. (Eds.), Vol. V, Mérida Yucatán, México, 57-71 pp.
- Rodríguez, J., LeMoullac, G., 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191, 109-119.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., LePriol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sánchez, A., Van Wormhoudt, A., 2001b. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 259, 1-22.
- Rosas, C., Cuzon, G., Arena, L., Arena, L., Lemaire, P., Soyeux, C., Van Wormhoudt, A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 249, 181-198.

- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., VanWormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 268, 47-67.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Van Wormhoudt, A., 2001a. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda ; Penaeidae). *Aquaculture Research* 32, 1-20.
- Rosas, C., López, N., Mercado, P., Martínez, E., Effect of salinity acclimation on oxygen consumption of white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal Crustacean Biology* 21[4], 279-292. 2001.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C., 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.
- Sritunyalucksana, K., Söderhall, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53-69.
- Teshima, S. I., 1998. Nutrition of *Penaeus japonicus*. *Reviews in Fisheries Science* 6, 97-111.
- Vargas-Albores, F., Gúzman, M. A., Ochoa, J. L., 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 299-303.
- Zar, J. H., 1974. *Bioestatistical Analysis*, Prentice Hall, Englewood Cliff.