

**VI. ATRACTANTES,
INMUNOESTIMULANTES Y
PIGMENTOS**

Contenido

QUIMIOATRACCION EN CRUSTACEOS: PAPEL DE MOLÉCULAS HOMOLOGAS	365
EVALUACION DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACION ORAL DE INMUNOESTIMULANTES EN LAS ENFERMEDADES DE ESPECIES PARA ACUACULTURA	403
RESUMEN DE LA EVALUACION SOBRE LA UTILIZACION DE ASTAXANTINA EN NUTRICION DE CAMARONES	423
POSIBILIDADES DE INMUNOESTIMULACION DEL CAMARON A TRAVES DEL ALIMENTO	433
LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS PLASMATICAS DE CAMARON	441

QUIMIOATRACCION EN CRUSTACEOS: PAPEL DE MOLÉCULAS HOMOLOGAS

Roberto Mendoza, Jesús Montemayor, Julia Verde y Carlos Aguilera

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas
Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza Nuevo León México
C.P 66450. A.P. F-56. Tel/Fax + (8) 3529772
E-mail: rmendoza@ccr.dsi.uanl.mx**

RESUMEN

El uso de atractantes en los alimentos balanceados ha adquirido una enorme importancia económica y ecológica, ya que mediante su utilización resulta posible optimizar las tasas de conversión alimenticias al maximizar el consumo y reducir el desperdicio del alimento, lo cual repercute directamente sobre los costos de producción. Sin embargo, a pesar de que la quimiorecepción como área de estudio data de al menos 20 años, en la actualidad se cuenta con escasos productos comerciales eficaces y aún se desconoce el potencial de numerosas moléculas. En efecto, la mayor parte de los estudios se han restringido a evaluar extractos orgánicos y algunas moléculas sintéticas tales como amino ácidos y nucleótidos. Considerando esta premisa, se llevaron a cabo una serie de experimentos con *Macrobrachium rosebergii* orientados a la evaluación del potencial de moléculas naturales. Dos aminos biogénicas (Putrescina y Cadaverina) y dos feromonas (una presente en la orina de jaiba y otra presente en extractos de glándula de la orina de langostino) fueron comparadas con productos de referencia cuyo poder attractante había sido demostrado, tales como extractos de calamar y un attractante comercial. Cada uno de los attractantes fue agregado a una dieta formulada para que no tuviera ningún poder attractante. Los resultados fueron obtenidos mediante tres aproximaciones diferentes. Primero se llevo a cabo un bioensayo de quimioatracción, el cual consistió en medir el tiempo que tardaba un animal en presentar diferentes etapas alimenticias (percepción, orientación, movimiento, arribo e ingestión). Una segunda aproximación fue realizada en una granja comercial. Para este efecto, se colocó una cierta cantidad de alimento con el attractante a probar en una charola, la cual fue sumergida en una jaula (1 m³) en la que se habían colocado 10 individuos (5 machos y 5 hembras) de un peso promedio de 20 g. La charola fue levantada a diferentes tiempos (10, 20, 40 y 80 minutos) para estimar el número de pelles consumidos. Se llevaron a cabo tres repeticiones por tratamiento. Una tercera aproximación destinada a corroborar la ingestión del alimento consistió en incorporar un anticuerpo en este. Siguiendo una metodología similar a la anterior, se colectaron los hepatopancreas y las partes bucales de 3 individuos a cada tiempo. Más tarde se realizaron pruebas de inmunodifusión para constatar la ingestión. Los resultados obtenidos

a partir de las diferentes pruebas, mostraron que la cadaverina incluida al 0.2% resultó el atractante más potente. Por otra parte, las orinas de jaiba y de langostino mostraron buenos resultados únicamente con los machos, de aquí que su utilización pueda ser recomendada para cultivos monosexuales.

INTRODUCCION

La necesidad de optimizar las tasas de conversión alimenticia y de reducir los problemas asociados con la acumulación de sedimentos orgánicos en los estanques, han sido identificados como algunos de los puntos más importantes para lograr disminuir los costos de producción en las empresas acuícolas. Para llevar a cabo este propósito es necesario adoptar medidas que permitan preservar un ambiente adecuado para el buen desarrollo de los organismos en cultivo y, al mismo tiempo, disminuir el posible impacto ambiental en la zona en donde son liberados los efluentes (Boyd y Tucker, 1995).

Una alternativa viable para solventar este tipo de problemas consiste en la adición de atractantes a las dietas comerciales, propiciando de ésta manera que el animal localice rápidamente el alimento, lo que conlleva a aumentar la probabilidad de ingestión. Adicionalmente, esta medida implicaría disminuir la incorporación de ligantes en el alimento, cuya presencia puede resultar detrimental para la calidad del mismo (Mendoza, 1993), y por otra parte permitiría la incorporación de fuentes proteicas vegetales, que como la soya, al ser incluidas en proporciones importantes en la formulación resultan en la disminución de los niveles de ingestión (Lee y Meyers, 1996a y 1996b).

Lo expuesto anteriormente responde a algunas de las necesidades de la industria acuícola, la cual viene exigiendo mejores alimentos en términos de atracción, para de esta forma asegurar la ingestión del mismo, ya que una dieta, por más completa que sea, si no es ingerida de inmediato o en un corto lapso de tiempo, es poco probable que se aproveche su valor nutricional. Asumiendo que una dieta contenga una mezcla ideal de proteínas, vitaminas y minerales, esta requiere que todo el alimento que se ofrece al organismo sea consumido, en la práctica esto raramente se cumple ya que una proporción de la dieta no es ingerida, lo cual reduce la tasa de conversión alimenticia, causando además una cierta contaminación en el agua.

Por otra parte, debe considerarse que el alimento representa entre el 50 y el 60% de los costos de producción en una granja de langostino, por lo que es de suma importancia buscar alternativas para que su valor nutricional sea aprovechado al máximo.

No obstante que la inclusión de atractantes de buena calidad se considere definitiva para garantizar la ingestión de los alimentos en condiciones comerciales, dichas condiciones resultan ser a menudo adversas para la fácil localización del alimento, debido principalmente a la importante disolución de los atractantes en grandes volúmenes de agua y a la existencia de una gran variedad de moléculas con poder igualmente atractante presentes tanto en el bentos como en la columna de agua.

Por otro lado, cabe remarcar la limitada investigación sobre la detección de comportamientos alimenticios y/o quimiorrecepción en crustáceos de agua dulce comparada con la existente para crustáceos marinos (Tierney y Dunham, 1982).

Considerando el contexto anterior, el presente trabajo se orientó a demostrar el potencial de atracción de moléculas naturales hasta ahora nunca probadas, como lo son las feromonas y las aminas biogénicas en las dietas para langostinos.

ESPECIE

No obstante que el 90% de la actividad acuícola esta centrada en la producción de camarones peneidos, debido a lo atractivo que resulta la exportación de este producto, existen recursos con un enorme potencial aún no completamente explotado entre los crustáceos de aguas continentales, como el caso de langostino *Macrobrachium rosenbergii*, el cual presenta ventajas considerables para su cultivo, tales como poca agresividad, rápido crecimiento y adaptabilidad a las condiciones de cultivo, entre otras (Magallón, 1980).

QUIMIORRECEPTORES

En los crustáceos, los quimiorreceptores están divididos en función de su estructura, en astetascos (Figura 1) y no astetascos (Ache y Derby, 1985). Los astetascos se encuentran exclusivamente en el flagelo lateral de las anténulas en donde se componen como mechones de sensillia inervados por múltiples células bipolares (400,000/antenua). Los axones de los receptores celulares forman el nervio antenular que se proyecta hacia el lóbulo olfatorio del protocerebro de los crustáceos. Por otra parte, los movimientos antenulares desempeñan un papel significativo en la fisiología de la quimiorrecepción adaptándose al ambiente local al cual están expuestos los astetascos propiciando cambios mecánicos en la posición de los receptores. En efecto, los movimientos de las antenas sirven para aumentar la exposición de los astetascos a los químicos propiciando la circulación del agua (Pearson, et al., 1977).

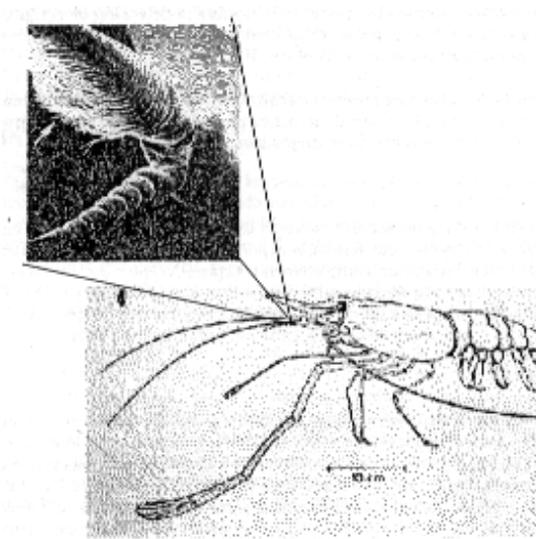


Figura 1. Localización de los astetascos.

La función de los astetascos esta asociada con el sentido del olfato (receptores de distancia), mientras que otro tipo de quimiorreceptores sensitivos localizados en apéndices masticadores y partes bucales funcionarían como el sentido del gusto (receptores de contacto). Así, un animal es capaz de detectar el alimento a distancia mediante el tipo de receptores antenales (astetascos) y una vez que se ha acercado a este lo explora con los pereiópodos y apéndices bucales en donde intervienen los receptores de contacto, de esto dependerá que acepte o rechace el alimento (Atema, 1977).

Cabe mencionar que la habilidad para percibir la presencia y calidad del alimento se debe considerar no sólo como una ventaja que poseen los organismos sino también como una estrategia energética, ya que se minimiza el tiempo de búsqueda y se maximiza la proporción neta de energía o nutrientes ingeridos. La decisión para alimentarse se realiza bajo la influencia de diferentes factores, tanto internos (nivel de inanición, dominancia social, sexo y estatus reproductivo), como externos (presencia de predadores o competidores).

ACTIVADORES E INHIBIDORES DEL COMPORTAMIENTO ALIMENTICIO

Existe cierto grado de confusión en torno a la clasificación de los estímulos químicos, por lo que muchos incitantes o estimulantes alimenticios han sido erróneamente identificados como quimioatractantes. Esto ha originado que muchos de los primeros reportes tengan un valor comparativo limitado debido a la inconsistencia en la metodología y a la pobre descripción de las condiciones del medio ambiente, la salud de los animales y la variabilidad individual (Derby y Atema, 1982).

Según Lindstedt (1971), Heinen (1980) y Mackie (1982) existen diferentes activadores e inhibidores del comportamiento alimenticio (Figura 2).

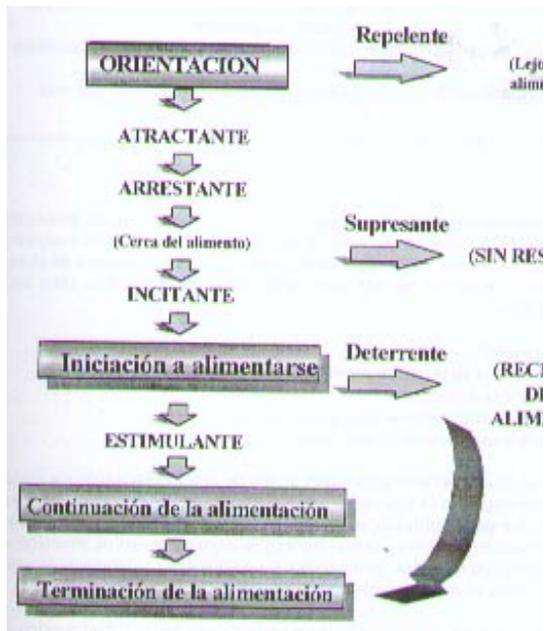


Figura 2. Activadores e inhibidores del comportamiento alimenticio.

Para describir de manera precisa y poder predecir las respuestas a un estimulante alimenticio, las diferentes clases de estímulos deben ser inicialmente clasificados, categorizándose entonces las respuestas comportamentales para cada estímulo específico. Estos comportamientos (Tabla 1) ya han sido identificados en los crustáceos (Lindstedt, 1971; Mackie y Mitchel, 1985; Lee y Meyers, 1996a).

Tabla 1. Características de las fases que presentan los estímulos químicos.

Fases	Característica
Orientación	Fase durante la cual los químicos pueden actuar como atractantes, repelentes o arrestantes.
Iniciación a alimentarse	En esta fase los químicos pueden actuar como incitantes o supresores.
Continuación de la alimentación	Los químicos pueden actuar como estimulantes o deterrentes.
Terminación de la alimentación	Los deterrentes actúan provocando que cese la ingestión.

ATRACTANTES

Dentro de las aproximaciones utilizadas para investigar el papel de los atractantes, la mayor parte de los estudios realizados se han restringido a evaluar extractos orgánicos y en ocasiones algunas moléculas puras. Esto ha originado que los productores de alimentos utilicen compuestos a los que se refieren como atractantes, encontrándose entre los más conocidos los siguientes:

- Harina de pescado
- Extractos solubles de pescados marinos
- Harina de cabeza de camarón
- Harina de calamar o aceite de hígado de calamar
- Extracto hidroalcoholosoluble de calamar

Sin embargo, su inclusión como atractantes dentro de la formulación de los alimentos implica ciertos problemas debido a la variabilidad del producto, determinada a su vez por el tipo de proceso, la especie utilizada, el estado de la materia prima, etc. Por otra parte, no obstante que actualmente existen algunas moléculas cuyo potencial de atracción ya ha sido demostrado, tales como ciertos aminoácidos y compuestos cuaternarios de amonio, su utilización es limitada ya que su empleo resulta oneroso (Holland y Borski, 1993).

Dentro de la amplia gama de extractos de organismos acuáticos probados como atractantes, cabe mencionar en particular las investigaciones desarrolladas con extractos de moluscos, crustáceos y otros organismos, como se ilustra en la Tabla 2.

De manera general se han identificado tres características importantes de los estímulos alimenticios presentes en estos extractos:

- a) Los estimulantes más potentes son metabolitos comunes de bajo peso molecular (aminoácidos, compuestos cuaternarios de amonio, nucleótidos y ácidos orgánicos).
- b) Especies diferentes pueden responder a diferentes sustancias presentes en un mismo extracto.
- c) La estimulación del comportamiento alimenticio de la mayor parte de los extractos se debe a una mezcla de sustancias más que a una sustancia dominante.

Tabla 2. Resumen de los bioensayos realizados con extractos de moluscos, crustáceos y otros organismos.

Grupo	Extracto	Especie	Resultados	Moléculas	Autor
Molusco	Alcoholosoluble de calamar	Erimacrus isenbekii	positivo	Ac. glutámico, glicina, prolina, beta`na, taurina	Takei, 1977
Molusco	Alcoholosoluble de calamar	Homarus gammarus	positivo	N.I.*	Mackie y Shelton, 1972
Molusco	Extracto de bivalvo, Perna canaliculus	Penaeus esculentus	negativo	N.I.	Hill y Wassenberg, 1987
Molusco	Ext. de Mytilus edulis (fracc. de bajo M.W.)	Homarus americanus	positivo	N.I.	Derby, 1984
Molusco	Ext. de Mytilus edulis (fracc. de alto M.W.)	negativo americano	N.I.	Derby, 1984	
Molusco	Mezcla sintáctica	salmo gairdneri	positivo	N.I.	Mackie, 1973b
Molusco	de calamar	Scophthalmus maximus	positivo	prolina, glicina, alanina, arginina	Mackie, 1973a
Molusco	Extracto de calamar	Homarus gammarus	positivo	Mackie y	
Molusco	Extracto de calamar	Scophthalmus maximus	positivo	Mackie y	
Molusco	Ensilado de vísceras de abulón	Haliothis fulgens	positivo	N.I.	Adron, 1978
Molusco	Caracoles en descomposición	Coenobita rugosus	positivo	N.I.	Viana et al., 1994
Molusco	Extracto de ostras	Logodon rhomboides	positivo	beta`na	Rittschhof, 1980
Crustáceos	Extractos de jaiba y camarón	Palaemonetes pugio	positivo	glicina	Carr et al., 1977
Crustáceos	Extractos de jaiba	Palaemonetes pugio	positivo	glicina	Carr y Dreby, 1986
Crustáceo	Ext. del camarón	Penaeus esculentus	positivo	N.I.	Carr y Dreby, 1984
	Metapenaeus benattae				Hill y Wassenberg, 1987

(Continúa Tabla 2)

Grupo	Extracto	Especie	Resultados	Moléculas	Autor
Crustáceo	Extracto de Krill	Pagrus major	positivo	N.I.	Shimizo, et al. 1990
Crustáceo	Euphausia superba	penaeus vannamei	positivo	N.I.	Holland y Borski, 1993
Otros	Extracto de cabeza de Camarón P. monodon	Chysophrys major	positivo	aminoácidos	Fuke et al., 1981

* N.I. = No Identificada.

Como grupo estas sustancias son solubles en agua y se presentan de manera ubicuita en los tejidos a concentraciones mayores que las presentes en el medio ambiente.

AMINOACIDOS

Los aminoácidos libres son abundantes como osmolitos en los tejidos de todos los invertebrados acuáticos, los cuales constituyen la dieta principal de los crustáceos omnívoros. Debido a que los aminoácidos se difunden rápidamente de las presas muertas, ellos probablemente determinan la frescura de los tejidos (Zimmer-Faust, 1987). De la misma manera que en los extractos, la acción de los aminoácidos es sinérgica, ya que estos resultan más efectivos en forma conjunta que cuando se usan por separado (Heinen, 1980).

Por otra parte, en el caso de los bioensayos con aminoácidos, las generalizaciones resultan delicadas puesto que en la mayor parte de los casos sólo se han probado algunos aminoácidos y eso únicamente con ciertas especies, lo cual implica el desconocimiento sobre el potencial de la mayor parte de estos. En la Tabla 3 se sumarizan algunas series experimentales que denotan la eficacia de algunos aminoácidos en particular.

Tabla 3. Resumen de los bioensayos realizados con aminoácidos como atractantes alimenticios en diferentes especies.

Aminoácidos	Organismo	Resultado	Autor
L-glutámico	Crustáceos Decápodos	positivo	Heinen, 1980
glicina, taurina	Homarus americanus	positivo	McLeese, 1970
arginina, lisina	Ostrina sp.	positivo	Beck y Hance, 1958a
taurina	Penaeus merguensis	positivo	Hindley, 1975
lisina, arginina	Macrobractium rosenbergii	positivo	Harpaz et al. 1987
taurina, glicina			
arginina			
taurina, prolina	Pleuronectes platessa	positivo	Mackie, 1980
arginina, glicina			
alanina			
arginina	Palaemon elegans	positivo	Kurmaly, 1990
glicina	Cambarus sp.; Panalirus sp.	positivo	Hodgson, 1958
arginina, lisina	Oreonectes limusus	positivo*	Hatt, 1984
taurina			
arginina	Penaeus japonicus	positivo	Kitabayashi et al., 1971b
arginina	Homarus americanus	positivo	Carter y Steele, 1982b
arginina Penaeus japonicus			
Lisina	Homarus amicanus	positivo	Nakamura, 1987b
Lsoleucina, glicina			
hidroxi-L-prolina	Oreonectes virilis	positivo	Carter y Steele, 1982b
L-glutamato, L-valina			
glicina, L-glutamato	Oreonectes rusticus	positivo	Tierney y Atema, 1987
glicina, taurina	Panulirus argus	positivo	Derby y Atema, 1988
L-arginina	Macrobrachium rosenbergii	positivo*	Derby y Harpaz, 1988
taurina			
hidroxi-prolina	Homarus americanus	positivo*	Derby y Atema, 1988
taurina			

(Sigue **Tabla 3**)

Aminoácidos	Organismos	Resultado	Autor
L-glutamato, taurina hidroxi-L-prolina L-arginina L-glutamato hidroxi-L-prolina L-aspartato, L-arginina, glicina	Homarus americanus	positivo*	Corotto, et al. 1992
		Homarus americanus	positivo* Derbi y atema, 1981

*bioensayos realizados mediante técnicas electrofisiológicas

*citados por linstedt, 1971

*citados por lee y meyers, 1996a.

OTRAS MOLÉCULAS

Además de los estudios realizados con aminoácidos, se han probado con buenos resultados otras moléculas tales como nucleótidos, compuestos cuaternarios de amonio, compuestos nitrogenados, azúcares y otras moléculas, como se muestra en la Tabla 4. Destacan los resultados obtenidos en bioensayos realizados con betaína, trimetilamina y los nucleótidos ATP, ADP, etc., (Harpaz et al., 1987) observándose en la mayoría de los casos que los compuestos más degradados funcionan mejor como atrayentes que los compuestos con alta carga energética.

Tabla 4. Bioensayos realizados en los cuales se probaron diferentes moléculas como atractantes alimenticios de organismos acuáticos.

Grupo	Molécula	Organismo	Resultado	Autor
Nucleotico	(AMP) Adenosina monofosfato	Palaemonetes pugio	positivo	Carr Thompson, 1983
Nucleotico	(ATP) Adenosina Trifosfato	Palaemonetes pugio	negativo	Carr Thompson, 1983
Nucleotico	(IMP) Inosina 5' Monofosfato	Scophthalmus maximus	positivo	Mackie y Adron, 1978
Nucleotico	(ATP) Adenosina Trifosfato	Penulirus sp.	positivo	Zimmer-Faust, 1987
Nucleotico	(AMP) Adenosina monofosfato	negativo	Zimmer-Faust, 1987	
Nucleotico	Xantina	Haliotis discus	positivo	Harada, 1986
	AMP y Citosina			
Nucleotico	IMP, AMP	Palaemon elegans	positivo	Kurmal et al., 1990
C.C. de A.	Beta`na y Trimetilamina	Macrobrachium rosenbergii	positivo*	Harpaz, et al., 1987
C.C. de A.	Beta`na	Macrobrachium rosenbergii	positivo*	Harpaz y Stainer, 1990
C.C. de A.	Beta`na	Macrobrachium rosenbergii	negativo	Sick, 1976
C.C. de A.	Beta`na	Negaprion brevirostris	positivo	Hodgson y Mathewson, 1976
C.C. de A.	Beta`naLagodon rhomboides	positivo	Carr y Chaney, 1975	
C.C. de A.	Beta`na, Cloruro de Amonio	Homarus americanus	positivo	Carotto, et al. 1992
C.C. de A.	Beta`na	Orconectes limosus	positivo	Hatt, 1984
C.C. de A.	Beta`na	Lagodon rhomboides	positivo	Carr y Chaney, 1975
C.C. de A.	Beta`na	Panulirus agus	positivo	Derby y Atema, 1988
C.C. de A.	Beta`na	Palaemonetes pugio	positivo	Carr, 1978a
C.C. de A.	Beta`na	Macrobrachium rosenbergii	positivo	Derby y Harpaz, 1988a
C.C. de A.	TMAH	Macrobrachium rosenbergii	positivo	Costa-Pierce y Laws, 1985
C.C. de A.	TMAO	Cambarus sp.	positivo	Hodgson, 1958b
C.C. de A.	TMAO	Palaemon elegans	positivo	Kurmaly et al., 1990
C.C. de A.	Urea	Penaeus marginis	negativo	Hindley, 1975
Azucar	Celobiosa, Suerosa y Maltosa	Orconectes rusticus	positivo	Tierney y Atema, 1987
Azucar	Maltosa, Dulcitol y Filodulcina	Haliotis discus	positivo	Harada et al., 1994
A.B.	Putrescina	Orconectes rusticus	positivo	Tierney y Atema, 1987
O.M.	Sal sintética	Macrobrachium rosenbergii	positivo	Derby y Harpaz, 1988

C.C. de A.: Compuestos Cuaternarios de Amonio

* Resultados obtenidos mediante técnicas electrofisiológicas.

a citados por Lee y Meyers, 1996a

b citados por Lindstedt, 1971

FEROMONAS

Las feromonas han sido definidas como aquellas sustancias que al ser secretadas al medio ambiente por un individuo y percibidas por otro, regularmente de la misma especie, originan una reacción específica (Buchau y Fontaine, 1984). Se ha reportado para un gran número de especies que las feromonas facilitan la cópula, ya que propician la atracción de los machos hacia las hembras o viceversa.

El grado de avance en el conocimiento de las feromonas ha llegado a un punto en el que se puede generalizar acerca de su estructura molecular, así se sabe actualmente que los atractantes sexuales son en general compuestos que contienen entre 10 y 17 átomos de carbono y cuyo peso molecular varía entre 180 y 300 Daltons (Wilson, 1963 citado por Gleeson, 1990).

En lo que concierne a la estructura de las feromonas acuáticas, estas han sido pobremente descritas, con excepción de algunas hormonas esteroides y sus derivados glucoronoides en el caso de los peces (Carr, 1982).

En el caso de los crustáceos, la frecuente sincronización entre la muda y la cópula en ciertos grupos ha llevado a varios investigadores a proponer a la ecdisona y sus derivados como atractantes sexuales, o al menos como componente de un complejo feromonal (Bauchau, 1986), sin embargo, experimentos posteriores no apoyan esta conclusión, ya que cuando se probaron cuatro ecdisonas con *Homarus americanus* ninguna de ellas estimuló un comportamiento sexual. (Gleeson et al., 1984).

En otro experimento, se demostró que dos concentraciones de crustecdisona no estimulaban el comportamiento de cortejo en jaibas *Callinectes sapidus* (Gleeson et al, 1983).

Gleeson (com. pers.), en un estudio para caracterizar la feromona sexual de la jaiba *Callinectes sapidus*, encontró que la molécula no poseía características físicas de un esteroide, siendo posible que fuera un péptido pequeño.

Las feromonas se subdividen en disparadoras o inductoras, dependiendo del tiempo en que tarda en presentarse el efecto y su implicación en la fisiología del organismo receptor.

No todas las feromonas promueven una atracción positiva, en efecto, algunas pueden actuar como repelentes. Las mismas feromonas que atraen hembras o machos y viceversa pueden actuar como repelentes en animales del mismo sexo, particularmente durante el período de alimentación (Daloze, et al., 1980).

Hasta el momento, los métodos para la obtención de las feromonas se han basado en extracciones en las que se emplean organismos completos. Esto implica obviamente la utilización de un número elevado de individuos para obtener apenas una cantidad suficiente de feromona. Sin embargo, para muchas especies el mejor método consiste en extraer las feromonas directamente de las glándulas en las cuales se producen o almacenan, o bien, en su defecto

extraer el fluido en el cual se secretan, lo que reduce el número de organismos necesarios para su colecta (Nordlund, 1981).

En el caso particular de los crustáceos, algunos de los principales estudios se han centrado en la extracción de feromonas sexuales que son liberadas por medio de la orina. Esto se ha investigado con detalle en las hembras de *Carcinus maenas* durante la fase de premuda copulatoria.¹ Dicha feromona es percibida por los centros quimiorreceptores localizados en las anténulas de los machos. Se han postulado los órganos excretores (glándula de la orina o glándula verde), como el sitio más probable de síntesis, ya que los análisis de hemolinfa y otros órganos resultan sin actividad (Fontaine, et al., 1989).

El hecho de que la orina de los crustáceos sea almacenada es una indicación de la necesidad de una liberación controlada. Esta orina es liberada de un par de papilas bilaterales (nefroporos) localizados en la base de las antenas relacionado directamente a la corriente branquial, por lo que se sugiere que esta corriente es utilizada, entre otras funciones, como un sistema para dispersar la señal química. De hecho ha sido constatado que la corriente branquial llega a proyectar la orina a una distancia de siete veces la longitud corporal del animal (Atema y Cowan, 1986). Después de esta distancia se disuelve y se diluye. Posteriormente las corrientes locales se encargan de disipar y diluir aún más estas señales.

AMINAS BIOGÉNICAS

Las aminas biogénicas son moléculas provenientes de la degradación de diferentes aminoácidos (Gouygou et al., 1989), proceso que se presenta normalmente en condiciones de descomposición de la materia orgánica.

Con la finalidad de lograr un mejor entendimiento, se deben de tomar en cuenta los procesos que ocurren inmediatamente después de la muerte de un organismo. Primeramente, los sistemas de regulación cesan sus funciones y se detiene el suplemento de oxígeno y por consecuencia la producción de energía. Enseguida, las células empiezan una nueva serie de procesos caracterizados por la descomposición del glicógeno (glicólisis) y la degradación de compuestos ricos en energía, tales como el ATP.

En los organismos vivos el ATP es formado por la reacción entre el ADP y creatina fosfato (fosfágenos), formándose un reservorio de grupos de fosfatos ricos en energía en las células del músculo. Cuando este reservorio se agota, el ATP es regenerado a partir de ADP por refosforilación durante la glicólisis. Después de muerto el organismo, cuando cesa la regeneración, el ATP es rápidamente degradado y cuando sus niveles son bajos, se desarrolla lo que comúnmente se denomina rigor mortis (Huss, 1988).

¹ La fase de premuda copulatoira ocurre justo antes de la muda, durante esta fase las hembras liberan una feromona para atraer a los machos a fin de que estos las protejan, debido a que en ese momento presentan un exoesqueleto muy blando por lo cual pueden ser presa fácil de otros organismos o de sus congéneres. Este comportamiento juega un papel importante en la reproducción ya que es justo en el momento en que acaban de mudar cuando se lleva a cabo la cópula (siempre se producen una hembra "blanda" con un macho "duro".)

El ATP se degrada mediante una serie de reacciones de desfosforilación y desaminación hasta convertirse en inosina monofosfato (IMP), el cual a su vez se degrada en Inosina (HxR) y esta en hipoxantina (Hx) y ribosa (R).

Por otro lado, debido a la falta de oxígeno, la glicólisis se desarrolla en condiciones anaerobias y su producto final es el ácido láctico, el cual causa una disminución en los valores de pH y por lo tanto en la capacidad de las proteínas de retener agua, favoreciendo así las condiciones para el desarrollo de la actividad bacteriana y enzimática (caso de la catepsina D). La catepsina D tiene una actividad óptima a valores de pH de 4 y es de las enzimas más importantes para iniciar la degradación de las proteínas endógenas a péptidos, los que a su vez son degradados por otras catepsinas (A,B,C). De esta forma las proteínas se descomponen en péptidos de diferentes tamaños, que después son hidrolizados finalmente en aminoácidos y por último degradados (descarboxilados) en aminas biogénicas, por medio de las enzimas bacterianas.

En cuanto a las bases nitrogenadas, las clases más comunes que se encuentran en los animales acuáticos son el TMAO (óxido de trimetilamina) y las betainas. El TMAO puede ser reducido enzimáticamente a TMA (trimetilamina) por la TMAO reductasa de los microorganismos. La segunda reacción de descomposición es la formación de DMA (dimetilamina) y formaldehído (FA), esta reacción se puede llevar a cabo enzimáticamente o no enzimáticamente. Las betainas son componentes menores en el músculo de los peces pero se pueden presentar en grandes concentraciones en crustáceos y moluscos. El más común de estos compuestos es la glicina-betaina.

Uno de los factores que juega un papel importante dentro del proceso de descomposición es la presencia de la flora bacteriana tanto en la superficie (piel y branquias) como en el intestino del organismo recién muerto.

Los cambios que se observan después de la muerte de un organismo se presentan en la Figura 3.

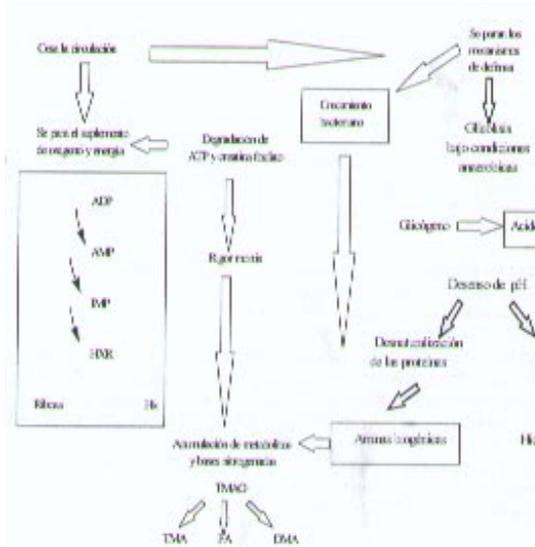


Figura 3. Cambios bioquímicos que se observan después de la muerte de un organismo.

Existen dos vías para la degradación de los aminoácidos, siendo la desaminación el mecanismo más común que permite a los microorganismos utilizar los aminoácidos libres. Esta desaminación bacteriana se puede llevar a cabo de diferentes formas en función de la constitución enzimática de los organismos y de las condiciones del medio ambiente. La desaminación puede dar como resultado la formación de amoníaco el cual es el componente primario relativo a la descomposición del alimento fresco. Por otra parte, la desaminación funciona regularmente como parte del mecanismo de transaminación. Otro mecanismo de degradación es la descarboxilación donde las bacterias juegan un papel importante para transformar los aminoácidos en aminas biogénicas y bióxido de carbono, ambas vías son mecanismos regulares de detoxificación y excreción de los organismos.

Dentro de las aminas que se forman más rápidamente y en mayor concentración destacan principalmente la putrescina y la cadaverina. La putrescina es formada a partir de la descarboxilación de la ornitina, la cual a su vez es producto de la desaminación de la arginina, mientras que la cadaverina es formada por la descarboxilación de la lisina (Fujita, et al. 1983).

Existen otras aminas menos abundantes como la tiramina y la histamina que derivan de los amino ácidos tirosina e histidina, respectivamente.

ESTUDIO SOBRE LA FUNCION DE AMINAS BIOGÉNICAS Y FEROMONAS COMO ATRACTANTES

La inclusión en el alimento de moléculas cuyo papel fisiológico es el de asegurar normalmente el comportamiento de atracción, puede resultar una alternativa interesante y económica. De aquí que se haya diseñado una serie experimental orientada a elucidar el potencial de atracción de moléculas homólogas, las cuales fueron comparadas con productos de referencia reconocidos como atractantes eficaces, tales como extractos de calamar y un atractante comercial.

Se llevaron a cabo tres diferentes aproximaciones: 1) Un bioensayo de quimiorrecepción en el cual diferentes atractantes fueron agregados a una dieta de base, en este caso la respuesta fué evaluada por medio de una serie de descriptores comportamentales. 2) Un bioensayo de campo en una granja comercial en donde se evaluó el consumo de diferentes dietas peletizadas (tratamientos). 3) Un segundo bioensayo de campo en el cual se monitorearon moléculas de referencia (anticuerpos) las cuales fueron incluidas en una dieta peletizada para demostrar la ingestión real del alimento.

SERIE EXPERIMENTAL

1. BIOENSAYO DE QUIMIORECEPCION

Tratamientos: Se compararon 7 tratamientos incluyendo dos testigos positivos y uno negativo:

- Cadaverina
- Putrescina
- Extractos de glándula de la orina de langostino
- Orina de Jaiba azul
- Testigo positivo-attractante comercial (Langobuds²).
- Testigo positivo-extracto hidroalcoholosoluble de calamar (Ex.HAS)
- Testigo negativo-dieta base

Extracción de feromonas de langostino: Para la extracción de las feromonas sexuales de langostino se llevó a cabo como un primer paso la identificación de las hembras en estadio precopulatorio. Para esto fueron identificados un grupo de 10 individuos de langostinos de ambos sexos mantenidos en condiciones adecuadas (temperatura de 25-28oC, pH 7.4, alimentación tres veces al día a razón del 3% de su biomasa) mediante la técnica propuesta por Sagi y Ra'anán (1985). Dicha técnica se basa en el examen externo del desarrollo gonadal de las hembras y el comportamiento reproductivo típico de los machos que es llevado a cabo sólo

² El uso de marcas o el nombre del fabricante no implica la recomendación de este producto

cuando las hembras son receptivas. Durante el desarrollo gonadal los ovarios crecen desde la parte posterior del cefalotórax y el desarrollo completo es fácilmente identificable a través del caparazón como una masa color naranja que ocupa una gran porción del cefalotórax, aproximadamente desde el corazón hasta la base del rostrum. Es durante esta última fase en la cual las hembras comienzan a liberar las feromonas sexuales con el fin de atraer a los machos. Las hembras que presentaban estas características fueron colectadas y sacrificadas con el fin de extraerles la glándula de la orina. Las glándulas fueron homogeneizadas y centrifugadas a 4,200 r.p.m. durante 20 minutos y el sobrenadante fue congelado para su utilización posterior.

La extracción de la orina de la jaiba *Callinectes sapidus* fue realizada en el Laboratorio Whitney de la Universidad de Florida, por el Dr. Richard Gleeson, siguiendo la metodología propuesta por él mismo (1990). Dicha metodología se basa en la extracción de la orina de hembras púberes, ya que esta ha sido identificada como la vía de liberación de las feromonas. La recolección se ejecuta por aspiración directa de los poros de la glándula antenal, por medio de una pipeta Pasteur modificada. La orina colectada es inmediatamente congelada y almacenada hasta obtener la cantidad necesaria para llevar a cabo los bioensayos.

Para comprobar la presencia de la feromona en la orina se llevaron a cabo bioensayos preliminares en acuarios en los cuáles se pusieron en contacto muestras de orina con machos adultos de jaibas y langostinos observando la eventual respuestas de excitación entre los mismos.

Para esto, fueron añadidos 300 μ l de la orina de jaiba al acuario en el cual se habían colocado langostinos machos “detectores” (aquellos que presentan dominancia en la población y se caracterizan por poseer pinzas color azul brillante), y se observó la respuesta provocada. Después de 24 horas se llevó a cabo un cambio parcial de agua (50%) y se añadieron 300 μ l de orina de langostino para observar igualmente la respuesta. La misma metodología se utilizó en acuarios conteniendo ejemplares machos en estado receptivo de la jaiba *Callinectes sapidus*.

A fin de corroborar que la respuesta observada fue ocasionada exclusivamente por la presencia de feromonas, se utilizaron otros tipos de estímulos tales como:

- a) agua de acuario libre de crustáceos
- b) trozos pequeños de músculo de langostino y de jaiba
- a) agua salada y dulce en los acuarios de langostino y jaiba, respectivamente.

Las observaciones realizadas demostraron la presencia de las feromonas en ambos casos ya que sólo cuando se les agregaba la orina, los machos de ambas especies exhibían comportamientos precopulatorios.

En el caso de las jaibas, los machos se levantaban y caminaban sobre las puntas de sus apéndices posteriores, extendiendo las quelas anteriores, mientras movían rápidamente sus apéndices bucales y las antenas.

Obtención de aminas biogénicas: Las aminas biogénicas fueron obtenidas comercialmente de Janssen Chimica,³ Bélgica.

Descriptorios: Para cada uno de los tratamientos se registraron los tiempos en que los ejemplares presentaron las diferentes fases de comportamiento alimenticio, esto es, percepción, orientación, movimiento hacia el estímulo, arribo al alimento e ingestión del mismo, tal y como lo recomiendan Costero y Meyers, (1993).

Categorización de la prueba: El test se registró como negativo si no llegaba a presentarse respuesta después de 500 segundos.⁴

Sistema experimental: La metodología que se utilizó fue similar a la propuesta por Costero y Meyers (1991), quienes describen el uso de acuarios de 120 cm de largo X 30 cm de ancho X 40 cm de altura. En este caso se introdujo una modificación consistente en eliminar el flujo de agua. Estos acuarios tienen una división removible en un extremo lo que permite mantener a los animales mientras se coloca el alimento en el otro extremo del acuario. Se utilizó únicamente un solo individuo por prueba debido principalmente a que la presencia de un eventual competidor pudiera potenciar el efecto del atractante e influir en la tendencia de los resultados. Los individuos no fueron reutilizados después de las pruebas para evitar cualquier tipo de preferencia por un atractante en particular. Después de cada prueba se vaciaron los acuarios y se llenaron con agua fresca que presentaba las mismas características de temperatura ($26 \pm 1^\circ \text{C}$) y pH (7.5-8). Esto se realizó con la finalidad de evitar que los estímulos dispersos en el agua de un bioensayo anterior afectaran las respuestas de los organismos a los nuevos estímulos. Se utilizó un fotoperiodo natural y las pruebas se corrieron siempre a la misma hora del día, para evitar cualquier posible influencia de la luz.

Adición de atractantes: Los atractantes fueron agregados por aspersión a una dosis de 0.2%. Se utilizó como dieta base una formulación con un alto contenido de soya (30%) y harina de trigo lo cual le confiere un efecto antiatractante y antipalatable (Tabla 5). Dicha dieta fue utilizada como testigo negativo. El atractante comercial se mezcló con aceite de pescado y se espreó a la dieta peletizada. El resto de los atractantes fueron mezclados con agua destilada y espreados igualmente. Todos los atractantes fueron agregados en una base volumen:volumen, excepto por la cadaverina la cual se agregó en una base peso: volumen.

³ El uso de marcas o el nombre del fabricante no implica la recomendación de este producto.

⁴ Se consideró el tiempo de 500 segundos debido a que en bioensayos previos se determinó que después de este tiempo los individuos no cambiaban su comportamiento hacia un estímulo.

Tabla 5. Composición de la dieta base

Ingrediente (peso seco)	Porcentaje
Harina de Pescado	5.000
Pasta de soya	30.00
Harina de camarón	4.001
Harina de trigo	55.190
Lecitina	1.830
Aceite de pescado	2.701
Metionina	0.110
Mezcla vitamínica	0.220
Vitamina C	0.025
Monofosfato de Sodio	0.923

Registro de la prueba: Se utilizó una cámara video la cual se manejo a control remoto para evitar cualquier influencia sobre el comportamiento de los animales. Se cuantificaron las secuencias filmadas de los diferentes comportamientos alimenticios. Se utilizó un cronómetro para registrar el tiempo real, de manera simultánea al contador de la video-cámara. El tiempo cero fue considerado a partir del momento en que se levantó la división del acuario. Cada secuencia filmada fue evaluada por dos personas independientes.

Diseño Experimental: Para confirmar el efecto de atracción sobre los sexos se llevaron a cabo cinco repeticiones para cada tratamiento con hembras y con machos por separado. Los ejemplares de langostino utilizados (35 machos y 35 hembras de 20 + 3 g) fueron mantenidos en una pileta de fibra de vidrio con capacidad de 1,500 litros (40 cm de altura X 200 cm de diámetro). Estos fueron escogidos de manera aleatoria y se colocaron en un acuario limpio 24 horas antes de cada prueba con el fin de estandarizar el tiempo de inanición antes del bioensayo. Todos los animales probados se encontraban en fase de intermuda, puesto que ha sido sugerido que el nivel de respuesta varía de acuerdo con la etapa del ciclo de muda (Harpaz et al., 1987). La designación de las diferentes etapas se realizó de acuerdo a los criterios descritos por Peebles (1977). Se empleó un ANOVA para determinar las eventuales diferencias entre los tratamientos. Cuando se llegaron a detectar diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó una prueba de comparación múltiple de Tuckey (Steel and Torrie, 1980). Para detectar diferencias eventuales entre los sexos se aplicó una “t” de Student .

2. BIOENSAYO DE CAMPO (PRUEBA DE INGESTION POR MEDIO DE CHAROLAS)

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos en el laboratorio se llevó a cabo un bioensayo de ingestión, el cual se realizó en una granja de langostino (Granja Acuícola Los Desmontes, Tecomán, Colima), en donde se evaluó la ingestión de cada uno de los atractantes

en condiciones de producción con el fin de probar el poder attractante y palatable de cada dieta en grandes volúmenes de agua y en presencia de otros attractantes naturales. Este bioensayo se orientó hacia la observación directa de la ingestión del alimento.

Condiciones experimentales: En una jaula de un metro cubico se colocaron 10 ejemplares de langostino (5 hembras y 5 machos) con un peso promedio de $20 + 3g$, de acuerdo a la densidad utilizada en la granja. A los langostinos se les ofrecieron 80 pellets de tamaño uniforme (0.4 cm) en una charola (cantidad equivalente a 6 gramos de alimento). Las charolas fueron levantadas a diferentes tiempos (10, 20, 40 y 80 minutos). El número de pellets presente fue contabilizado a cada tiempo, para que, por diferencia con respecto al número inicial de ellos, se obtuviera el número de pellets consumido. Se llevaron a cabo tres replicados por tratamiento. Los tratamientos comparados fueron los mismos que aquellos establecidos para el bioensayo de laboratorio, siendo la única variante la dieta de base a la cual fueron agregados los attractantes; en este caso se utilizó la dieta comercial empleada regularmente en la granja. Se utilizó un ANOVA para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba de separación de medias de Tuckey.

3. BIOENSAYO DE CAMPO (MONITOREO DE INGESTION POR UN METODO INMUNOLOGICO)

Un tercer bioensayo también a escala comercial fue llevado a cabo con el fin de constatar que efectivamente había existido ingestión de los pellets con attractantes. Para este efecto se empleó un método inmunológico destinado a determinar cual de los tratamientos resultaba más eficaz. Para llevar a cabo esta fase experimental se elaboró un alimento similar a la dieta base con la diferencia de que en esta se incluyó 25% de suero conteniendo anticuerpos dirigidos contra adultos de *Artemia salina*.⁵ Dicho alimento se ofreció de manera similar que en el experimento anterior (en charolas) y después de cada uno de los tiempos anteriormente estipulados se colectaron 3 organismos a los cuáles se les seccionó el cefalotorax. Los cefalotórax conteniendo el hepatopáncreas y las partes bucales fueron congelados a $-20^{\circ}C$ y posteriormente fueron analizados por inmunodifusión. En este caso se consideró la presencia o ausencia de reacción inmunológica. Para detectar diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó una prueba de X^2 .

RESULTADOS

Los diferentes comportamientos relacionados con la detección e ingestión del alimento considerados para cuantificar la quimiotaxis, fueron similares a los identificados para otros crustáceos tales como *Panaeus vannamei* (Costero y Meyers, 1993) y *M. rosenbergii* (Harpaz, et al., 1987). En la Tabla 6 se presenta una breve descripción de estas fases.

⁵Se incluyó el suero al alimento debido a la alta proporción que se necesitaba, de tal forma que si se hubiese agregado el antígeno (*Artemia salina*) este podría haber actuado como attractante.

Tabla 6. Fases secuenciales del comportamiento alimenticio

de *Macrobrachium rosenbergii*

Fase	Comportamiento
Percepción	Esta fase está caracterizada por movimientos de las anténulas, las cuales se mueven a manera de látigo, lo que sirve para aumentar el contacto del estimulante con los quimiorreceptores. El ritmo y la velocidad de estos movimientos depende de la naturaleza del atractante.
Orientación	En esta fase el animal despliega movimientos antenales así como de los pereiópodos, con el fin de guiarse a la fuente del estímulo. El animal cambia continuamente su posición hasta apuntar su rostro hacia la fuente de atracción.
Movimiento	El animal inicia la locomoción hacia la fuente del estímulo, esta se lleva a cabo usando únicamente sus pereiópodos. Durante esta fase el primer par de pereiópodos continua su búsqueda en el área frontal y se lleva a la boca cualquier materia que encuentre en el camino. Los movimientos antenales y antenulares continúan efectuándose.
Arribo.	Es el evento final en el cual el animal llega a la fuente de estimulación. El animal hace contacto con los estímulos utilizando los pereiópodos y sus partes bucales en un movimiento típicamente exploratorio.
Ingestión	En esta fase el animal ingiere el alimento en definitiva o bien, lo rechaza.

El ANOVA reveló la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (atractantes) durante las diferentes fases del comportamiento alimenticio ($F= 10.57$; g.l. 10, 6 $P << 0.001$) (Tabla 7). Cuando se consideraron únicamente los machos en el análisis, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos durante las fases de Percepción, Orientación y Movimiento, siendo la dieta base la única excepción ya que mostró los peores resultados en términos de atracción. Las diferencias significativas se presentaron hasta la fase de Arribo, en la cual la cadaverina y los extractos de glándula verde de langostino generaron los mejores resultados, seguidos por el atractante comercial, la orina de jaiba y la putrescina, mientras que el extracto de calamar no evocó sino resultados mediocres, solo superando a la dieta basal. En la última fase (ingestión) se repitió la misma tendencia con la diferencia de que la cadaverina destaca aún más. En efecto, considerando la clasificación de efectores químicos del comportamiento alimenticio propuesta por Lindstedt (1971) y Mackie (1982) la dieta de base actuó no solo como un arrestante, ya que los animales cesaron su locomoción al estar cerca de esta fuente de estímulos; sino como repelente, ya que los animales se alejaban eventualmente de esta fuente; y aún como supresante ya que el inicio de la alimentación era inhibido cuando alguno de los animales llegaba tomar el alimento con sus apéndices masticatorios. Contrastando con lo anterior, los resultados fueron diferentes al considerar solamente a las hembras. En este caso se observó la siguiente categorización: cadaverina, putrescina, atractante comercial y extracto de calamar, seguido por las feromonas y la dieta base. Generalmente la cadaverina destaca no solo como el mejor atractante, ya que provocó que los animales se orientaran hacia las dietas que la contenían, sino también como el mejor incitante, propiciando el inicio de la alimentación; e incluso como el mejor estimulante promoviendo la ingestión y la continuación del alimento. Sin embargo, cabe

hacer notar que la cadaverina no difiere significativamente de la putrescina, del atractante comercial y del extracto de calamar, así como tampoco de las feromonas en el caso de los machos.

Al considerar el tiempo total entre las fases de percepción e ingestión (Figura 4), se pudo

Tabla 7. Promedio \pm S.D. (tiempo en segundos) obtenidos durante las diferentes fases de comportamiento alimenticio para cada tratamiento.

Tratamiento	Percepción		Orientación		Movimiento		Arribo		Ingestión	
	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Hembra										
Dieta base	110.8c \pm 15.09	104.4c \pm 27.19	231.5c \pm 47.06	198.0c \pm 32.90	349.0c \pm 51.41	268.6c \pm 46.67	473.0c \pm 37.51	448.4c \pm 50.02	496.0c \pm 7.15	478.0c \pm 37.25
Orina de jaiba	96.0bc \pm 83.10	25.6b \pm 10.43	202.0c \pm 33.2	39.0b \pm 20.57	257.8a \pm 179.8	52.2b \pm 13.70	434.0bc \pm 88.66	105.2ab \pm 16.88	439.4c \pm 46.22	112.0ab \pm 16.34
Estracto de glandula verde de langostino cadaverina	109.4c \pm 12.03	24.6b \pm 6.14	127.6bc \pm 11.94	34.8b \pm 7.91	194.2bc \pm 12.23	42.4b \pm 8.59	361.8b \pm 35.19	95.8a \pm 12.04	449.8c \pm 21.70	109.8ab \pm 17.12
Putrescina	20.2a \pm 4.70	23.6b \pm 7.40	28.2b \pm 8.16	25.2b \pm 7.44	37.8a \pm 14.53	38.0b \pm 8.30	78.8a \pm 24.10	92.0c \pm 12.28	100.6b \pm 19.20	104.4a \pm 9.09
Atractante comercial	28.2ab \pm 11.45	28.4b \pm 13.92	42.0bc \pm 27.15	43.4b \pm 15.63	51.0ab \pm 21.91	54.2b \pm 4.38	115.8a \pm 13.01	118.4ab \pm 14.99	126.2b \pm 19.30	127.4ab \pm 27.89
Estracto de calamar	39.0ab \pm 11.37	40.2b \pm 12.37	54.0bc \pm 21.26	49.2b \pm 15.38	65.2ab \pm 22.60	68.6b \pm 39.19	151.8a \pm 39.80	153.2b \pm 31.98	162.6b \pm 37.77	165.4b \pm 40.02

Las medidas de las columnas con el mismo superscript corresponden a grupos homogéneos (Comparación de medias por el método de Tukey)

notar que la progresión de estas fases fué particularmente rápida en el caso de las aminas biogénicas, el atrayente comercial y el extracto de calamar. La prueba de “t” de Student reveló diferencias significativas entre los sexos únicamente cuando fueron probadas la orina de jaiba y los extractos de glándula verde de langostino. En efecto, los machos percibieron e ingirieron el alimento más rápido que las hembras.

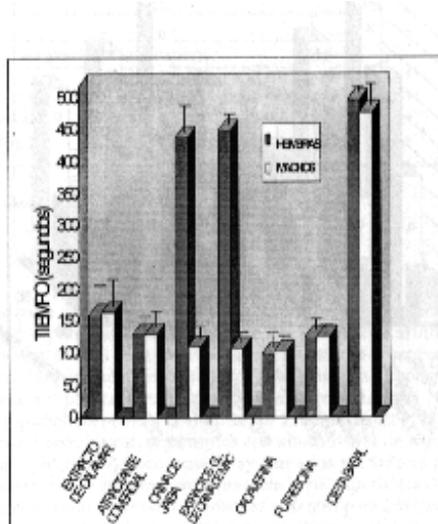


Figura 4. Tiempo transcurrido hasta la fase de ingestión.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos a partir de esta serie de bioensayos. Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F= 34.425$; g.l. 6, 72 $P << 0.001$) así como entre los diferentes tiempos ($F= 266.839$; g.l. 3, 72 $P << 0.001$). No se observaron diferencias significativas durante los primeros 10 minutos, pero a partir del periodo de 20 minutos, y de ahí en adelante se pudieron identificar diferencias en la tasa de consumo. Las diferencias más importantes fueron obtenidas con las aminas biogénicas y con los controles positivos. Sin embargo, las feromonas no lograron producir un incremento en el consumo. Estos

resultados fueron confirmados por medio de pruebas de inmunodifusión (Tabla 8). La prueba de X2 reveló la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2=23.57$; 6 g.l. $P << 0.001$).

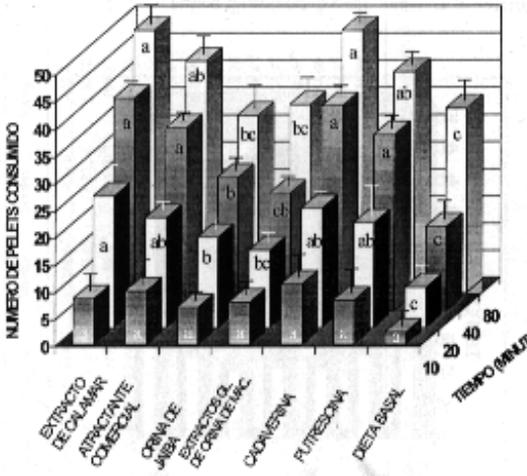


Figura 5. Número promedio de pellets consumido por tratamiento a diferentes tiempos de muestreo.

Tabla 8. Respuesta cualitativa observada por precipitaciones inmunológicas en condiciones comerciales.

Tratamientos	Repeticiones				
	1	2	3	4	5
Dieta base	—	—	—	—	—
Orina de jaiba	—	—	+	—	—
Extracto de glandula verde de langostino	—	—	—	+	—
Cadaverina	+	+	+	+	+
Putrescina	+	+	+	+	+
Atractante comercial	+	+	+	+	+
Extracto de calamar	+	—	+	—	+

(-) Sin respuesta

(+) Respuesta Inmunológica

DISCUSION

En la mayor parte de los estudios concernientes a la quimioatracción no se ha mostrado que alguna molécula purificada sea más potente que las mezclas artificiales o naturales de atractantes, como fue el caso de la cadaverina en este estudio al ser comparada con ambos testigos positivos. En particular, los resultados concernientes al poder de atracción de las aminas biogénicas nos proveen de diversos puntos de reflexión que podrían ser conjuntados en una teoría complementaria a la emitida por Zimmer-Faust (1987), quien señala que los crustáceos carnívoros buscan organismos con altos niveles de energía (en términos de carga energética de adenilato) lo cual puede ayudar a los predadores para reconocer a sus presas. En contraste con lo anterior, en la presente serie experimental se encontró que las aminas biogénicas funcionaron como atractantes potentes para *Macrobrachium*, crustáceo de hábitos omnívoros, indicando que tienden a ser atraídos por moléculas degradadas, las cuales son liberadas a menudo dentro del proceso de descomposición de los organismos, así como durante la excreción y que en consecuencia presentan un bajo valor en cuanto a carga energética. Por lo cual se podría considerar que la respuesta estaría adaptada al tipo de alimentación. Adicionalmente, las aminas biogénicas actuaron no solo como quimioatractantes (causando que el animal se desplazara hacia las dietas que las contenían) sino que también funcionaron como incitantes (disparando la respuesta alimenticia) y como estimulantes alimenticios (provocando que el animal siguiera alimentándose).

Un fenómeno similar ha sido reportado en el caso de los cangrejos ermitaños los cuales pueden localizar una nueva concha a cierta distancia (Kratz y Rittschof, 1991; Rittschof, 1990). La atractividad parece ser debida a péptidos específicos (generados por un proceso degradativo; dichos péptidos contienen un cierto número de residuos neutros y un residuo básico como arginina o lisina en el extremo carboxilo terminal) liberados a partir del tejido muscular de gasterópodos muertos o heridos, lo cual señala la disponibilidad de las nuevas conchas. De la

misma manera, las langostas son capturadas con mayor frecuencia en trampas en las cuales se utilizan abulones que han muerto un día antes, que cuando se utilizan abulones frescos (Lee y Meyers, 1996b; Zimmer-Faust et al., 1984). Otros estudios han reflejado la sensibilidad de los crustáceos a moléculas de este tipo, en efecto, la tasa de ingestión de dietas artificiales de langostinos juveniles se vio mejorada al adicionar hidrocloreuro de trimetilamina (TMAH) en la superficie de estas (Costa - Pierce y Laws, 1985). Se supuso que el TMAH simulaba el olor de pescado en descomposición induciendo así a los langostinos a comer.

Parece lógico suponer que las aminos biogénicas pudieran actuar de manera positiva, ya que el análisis de los fluidos naturales o de extractos de materias primas atractivas para los crustáceos han mostrado generalmente que los estimulantes principales son sustancias de bajo peso molecular cuyas propiedades son consistentes con la hipótesis de que se trata de aminoácidos o sustancias relacionadas (Heinen, 1980). La mayor parte de las sustancias de bajo peso molecular que han resultado ser estimulantes potentes y habitualmente atractantes en crustáceos, son los aminoácidos mientras que las azúcares, alcoholes, almidones y los ácidos grasos y otros compuestos han dado menores respuestas (o ninguna), esto puede ser atribuido a los hábitos alimenticios de la especie utilizada, así tenemos que *Orconectes rusticus* (herbívoros) es más sensible a azúcares que *Orconectes virilis* (carnívoro) el cual es más sensible a aminoácidos (Tierney y Atema, 1988).

Desde el punto de vista estructural, se ha reportado que el grupo amino no debe ser substituido y debe portar una carga para poder reaccionar con los quimiorreceptores, en contraste con las modificaciones a nivel del grupo carboxilo, incluyendo la remoción de una carga lo cual puede ser tolerado solo con una mínima pérdida de efectividad. (Hatt, 1984).

En lo que respecta a la orina de jaiba y a los extractos de glándulas verdes de langostino, las moléculas atractantes lograron tener un efecto marcado en los machos de *Macrobrachium*. Este hallazgo es controversial ya que las feromonas han sido definidas a menudo como moléculas que actúan de manera intraespecífica. Sin embargo los resultados de algunas investigaciones llevadas a cabo con crustáceos (Kittredge et al., 1971) e insectos (Rojas et al., 1990) han mostrado la posibilidad de acción intraespecífica. No obstante no se descarta la posibilidad de que otras moléculas tales como productos de excreción (e.g. urea, aminos terciarias, y ácidos nucleicos), presentes en la orina pudieran haber actuado como atractantes o bien, que hubieran potenciado el efecto de las feromonas.

La adición de atractantes por aspersión parece ser un buen método de suplementación, ya que de esta manera se encuentran disponibles casi inmediatamente al momento en que los pellets entran en contacto con el agua, produciendo así una respuesta rápida.

Los resultados obtenidos en los experimentos a escala comercial y en particular la comprobación inmunológica de ingestión mostraron, primeramente que la dieta comercial, a pesar de contener diferentes fuentes de atractantes naturales, tales como harina de pescado y aceite de pescado, no fueron lo suficientemente eficaces para atraer a los animales y estimular el proceso de alimentación. Este aspecto fue confirmado con la adición del attractante comercial

y las aminas biogénicas a la dieta. En lo que respecta al papel de las fuentes de feromonas en términos de ingestión, este fue relativamente pobre, posiblemente debido a su baja concentración o a su rápida disolución. Por otra parte los extractos de calamar han sido considerados a menudo como una buena fuente de atrayentes para los crustáceos (Takei, 1977; Mackie y Shelton, 1972; Mackie, 1973), sin embargo, siempre existe cierto riesgo al incorporar extractos naturales ya que la constancia en la composición de la materia prima no puede ser predecida, por lo cual se debe esperar cierta variabilidad, como fue el caso en este estudio.

Por medio de esta serie de experimentos, fue posible confirmar el papel potencial de las aminas biogénicas y las feromonas en términos de atracción y estimulación alimenticia. Adicionalmente, el presente estudio confirma que no solo los movimientos antenulares sino la secuencia completa de comportamientos de búsqueda de alimento, como lo describen Harpaz et al. (1987) puede ser inducida por la adición de un solo quimioestimulante. Sin embargo estos resultados pueden ser considerados solo como validos para adultos *M. rosenbergii* ya que los patrones de alimentación y de selección alimenticia varían a través del ciclo de vida de los crustáceos. En particular, las etapas larvales tienen diferentes hábitos alimenticios, así los quimioatractantes y estimulantes a los cuales responden cambian con el tiempo (Lee y Meyers, 1996a y 1996b). A este respecto, se ha reportado que las etapas larvales de los crustáceos dependen más de encuentros al azar con las partículas alimenticias para atraparlas (Kurmaly et al., 1990).

Un hecho que debe ser considerado es que la validez de los resultados se puede ver alterada por las concentraciones utilizadas, particularmente en el caso de las aminas biogénicas. Este parámetro resulta ser especialmente delicado, ya que existen antecedentes de efectos nocivos al utilizar las aminas biogénicas en grandes concentraciones (Smith, 1990; Cowey y Cho, 1992). En el otro extremo, si no se adiciona una concentración suficiente es probable que su efecto como atrayente se vea limitado. Esta consideración no debería perjudicar el eventual uso de éstas moléculas, puesto que se encuentran normalmente en todos los organismos vivos y cumplen con funciones biológicas particulares. Entre las funciones de la putrescina en el metabolismo de los organismos destaca que es esencial para el crecimiento celular y se cree que tiene un papel importante en la síntesis del DNA, RNA y proteínas (Pegg, 1984). También se le atribuye un rol en la estabilización de los ribosomas y un aumento en la absorción de aminoácidos por las células. Además, la Putrescina puede tener un papel promotor de crecimiento (Smith, 1990). Por otro lado, afectan las actividades de ciertas enzimas y en adición la Putrescina puede proteger a las células de un shock osmótico (Pegg, 1986, citado por Cowey y Cho, 1992).

En términos de aplicabilidad, la producción de aminas biogénicas resulta simple y poco onerosa (Susuki et al., 1994) y debe ser preferida a la adquisición de moléculas puras, ya que su precio aún a las concentraciones probadas, permanece alto (e.g. 1 kg de cadaverina = 203 USD). En el caso de las feromonas su utilización implica la necesidad de sintetizar las moléculas, pero pueden tener cierto potencial en los cultivos monosexuales o en la separación de sexos. Es necesario emprender un experimento en el que se estudie el efecto dosis - respuesta, igualmente resulta indispensable encontrar el umbral para la concentración funcional mínima y observar el efecto de estas moléculas al ser mezcladas con otras que pudieran potencializar su respuesta.

Adicionalmente se requieren correr pruebas paralelas de sustancias preparadas a partir de tejidos en descomposición.

Finalmente, la relevancia de este estudio se vió reflejada en el hecho de que la adición de diferentes atractantes promovió un aumento significativo en el consumo de la dieta comercial la cual ya contenía algunas fuentes de atractantes. Este aspecto es particularmente importante ya que la detección del alimento y su ingestión determinan finalmente el valor comercial de una dieta (Lee y Meyers, 1996b; Takeda y Takii, 1992).

CONCLUSIONES

Las moléculas utilizadas en el presente estudio resultaron ser atractantes e incitantes, destacando las aminas biogénicas Cadaverina y Putrescina. Este es un dato sumamente interesante tomando en cuenta que en la naturaleza la mayoría de los decápodos, debido a sus hábitos alimenticios, tienen marcadas preferencias por material en descomposición de origen animal o vegetal.

En lo que respecta a los testigos positivos, la ventaja del attractante comercial sobre el extracto de calamar es su consistencia en la composición, mientras que el extracto de calamar puede mostrar en algunas ocasiones buenos resultados, su composición depende de la especie, el tamaño, el estado fisiológico y su nutrición.

Las diferencias en atracción que se presentaron entre hembras y machos indican que las muestras de orina efectivamente presentaban actividad “feromonal”, ya que solo los machos eran atraídos hacia el estímulo. A pesar de no haber mostrado buenos resultados con hembras como los otros atractantes, existe cierto potencial para que estas pueden ser utilizadas en cultivos monosexuales de *Macrobrachium rosenbergii*.

Tomando en cuenta que el alimento representa entre el 50 y 60% de los gastos de operación en una granja de langostino, el uso de atractantes es una buena opción para mejorar las condiciones de cultivo y por lo tanto incrementar la rentabilidad del mismo.

BIBLIOGRAFIA

- Ache, B.W., Z. Fuzessery and W.E.S. Carr (1976) Antennular chemosensitivity in the spiny lobster, *Panulirus argus*: Comparative test of high- and low-molecular-weight stimulants. *Biol. Bull.* 151 273-282.
- Atema, J. and D. Cowan (1986) Sex-identifying urine and molt signals in lobster (*Homarus americanus*). *Journal of Chemical Ecology.* 12:2065-2080.
- Atema, J. (1988) Distribution of chemical stimuli. In: Atema, J., A.N. Popper, R.R. Fay & W.N. Tavolga, eds, *Sensory biology of aquatic animals*, pp. 29-56. Springer-Verlag, New York.

- Bauchau, A.G. (1986) Sex Pheromones in Crustacea. Elsevier Science Publishers B.V. *Advances in Invertebrate Reproduction* 4. M.Porchet, J.-C.Andries and A. Dhainaut editors. pp:337-243.
- Boyd, C. and C. Tucker.(1995). Sustainability of channel catfish farming. *World Aquaculture*. 26(3):45-53.
- Carr, W.E.S. and T. Chaney.(1975). Chemical Stimulation of Feeding Behavior in the Pinfish, *Lagodon rhomboides*: Characterization and Identification of Stimulatory Substances Extracted From Shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 54A:437-441.
- Carr, W.E.S. (1982). Chemical stimulation of feeding behaviour. In: *Chemoreception in Fishes*. Hara, T. Ed.. Elsevier Scientific Publishing Company. Canada.
- Carr, W.E.S and H.W.Thompson. (1983). Adenosine 5'-monophosphate, an internal regulatory agent, is a potent chemoattractant for a marine shrimp. *J.Comp. Physiol.*, 153:47-53.
- Carr, W.E.S., Netherton, J.C.III and M.L.Milstead. (1984). Chemoattractants of the shrimp *Palaemonetes pugio*: variability in responsiveness and the stimulatory capacity of mixtures containing amino acids, quaternary ammonium compounds, purines and other Substances. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A, 469-474.
- Carr, W.E.S. and C. Derby (1986) Behavioral chemoattractants for the shrimp, *Palaemonetes pugio*: identification of active components in food extracts and evidence of synergistic mixture interactions. *Chemical Senses* Vol. 11(1): 49-64.
- Corotto, F; R. Voigt and J. Atema (1992) Spectral tuning of chemoreceptor cells on the third maxilliped of the lobster, *Homarus americanus*. *Biol. Bull.* 183:304-306.
- Costa-Pierce, B.A. and E.A.Laws (1985) Chemotactically-active feed additive for prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *The Progressive Fish Culturist* 47(1), 59-61.
- Costero M.C. and S.P. Meyers (1993a) Evaluation of chemoreception by *Penaeus vannamei* under experimental conditions. *The Progressive Fish Culturist*. 55:157-162.
- Cowey, C.B. and C.Y. Cho (1992) Failure of Dietary Putrescine to Enhance the Growth of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 49:2469-2473.
- Daloze, D., J.C. Braekman and B. Tursch (1980) Chemical communication in the marine environment. In R. Gilles (ed.), *Animal Environmental Fitness. Physiological and Biochemical Aspects of Adaptation and Ecology*, Vol. 1 Invented lectures. Pergamon Press, Oxford, pp.243-261.
- Derby, C.D. and J. Atema (1982) The function of chemo- and mechanoreceptors in lobster (*Homarus americanus*) feeding behaviour. *Journal of Experimental Biology* 98, 317-327.

- Derby, C.D. (1984) Molecular weight fractions of natural foods that stimulate feeding in crustaceans, with data from the lobster *Homarus americanus*. *Mar. Behav. Physiol.* Vol 10, pp.273-282.
- Derby, C.D. and S.Harpaz (1988) Physiology of chemoreceptor cells in the leg of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A(1): 85-91.
- Derby, C.D. and J. Atema (1988) Chemoreceptor cells in aquatic invertebrates: peripheral mechanisms of chemical signal processing in decapod crustaceans. In *Sensory Biology of Aquatic Animals*. Atema, J., Fay, R.R., & Tavolga, W.N. eds). pp 365-385. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Fontaine, M.T., A.G.Bauchau and E.Passelecq-Gerin (1989) *Carcinus maenas* (L.)(Decapoda, Reptantia) sex pheromone: Site of synthesis. *Crustaceana*, 57(2):208-216.
- Fujita, K., T. Nagatsu and K. Shinpo (1983) Assay methods for polyamines. In *Methods in Biogenic Amine Research*. Edited by S. Parvez, T.Nagatsu & H.Parvez.
- Gleeson R.A., M.A. Adams, & A.B.Smith (1984) Characterization of a sex pheromone in the blue crab, *Callinectes sapidus*: Crustecdysone studies. *Journal of Chemical Ecology* 10(6):913-921.
- Gleeson, R.A., M.A. Adams and A.B. Smith (1987) Hormonal Modulation of Pheromone-Mediated Behavior in a Crustacean. *Biol. Bull.* 172: 1-9.
- Gleeson, R.A. (1990) Intrinsic factors mediating pheromone communication in the blue crabs, *Callinectes sapidus*. In: *Crustacean Sexual Biology*. Columbia University Press. New York. pp 17-32.
- Gouygou, J.P.; Mertin, C.; Sinquin, C. and Durand, P. (1989) Determination of biogenic amines in fish. *Oceanis*. 15: 599-604.
- Harada, K. (1986) Feeding Attraction Activities of Nucleic Acid-Related Compounds for Abalone, Oriental Weatherfish and Yellowtail. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 52(11):1961-1968.
- Harada, K., T. Miyasaki and T. Yakiyosi (1994) Chemoattract effects of sugar and their related compound on black abalone *Haliotis discus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109 A (1):111-115.
- Harpaz, S., Kahan, D., Galun, R and I. Moore (1987) Responses of fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*, to chemical attractants. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 13, No. 9.

- Harpaz, S. and J.E. Steiner (1990) Analysis of Betaine-induced feeding behavior in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1987) (Decapoda, Caridae). *Crustaceana* 58 (2) 175-185.
- Hatt, H. (1984) Structural requirements of amino acid and related compound for stimulation of receptors in crayfish walking leg. *J. Comp. Physiol. A.* 155:219-231.
- Heinen J.M. (1980) Chemoreception in decapod crustacea and chemical feeding stimulants as potential feed additives. *Proc. World Maricul. Soc.* 11:319-334.
- Hill J. and J. Wassenberg (1987) Feeding behaviour of adult Tiger Prawns, *Penaeus esculentus*, Under Laboratory Conditions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 38:183-190.
- Hindley J.P.R. (1975) The detection, location and recognition of food by juvenile banana prawns, *Penaeus merguensis* de Man. *Marine Behaviour and Physiology.* 3, 193-210.
- Hodgson, E.S. (1958) Electrophysiological studies of arthropod chemoreception. III Chemoreception of terrestrial and freshwater arthropods. *Biol. Bull.* 115:114-125.
- Holland, K.N. and B.J. Russell (1993) A palatability bioassay for determining ingestive stimuli in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 109:153-164.
- Kittredge, J.S., M. Terry and F.T. Takahashi (1971) Sex pheromone activity of the molting hormone, crustecdysone, on male crabs (*Phcygrapsus crassipes*, *Cancer antennarius* and *C. anthonyi*). *U.S. Fish Wildl. Serv. Fish Bull.* 69:337-343.
- Kratt C.M. and D. Rittschof (1991) Peptide attraction of hermit crabs *Clibanarius vittatus* Bosc: roles of enzymes and substrates. *Journal of Chemical Ecology.* 17: 2347-2365.
- Kurmaly, K., D.A. Jones and A.B. Yule (1990) Acceptability and digestion of diets fed to larval stages of *Homarus gammarus* and the role of dietary conditioning behaviour. *Marine Biology.* 106: 181-190.
- Lee, P.G. and S. Meyers (1996a) Chemoatraction and Feeding Stimulation in crustacea. *Aquaculture Nutrition aquaculture nutrition* (2): 157-164.
- Lee, P.G. and S. Meyers (1996b) Chemoatraction and Feeding Stimulation. In: *Crustacean Nutrition*. D' Abramo, L. Conklin, D. & D. Akiyama (Eds). *Advances in World Aquaculture Society Series. Volume 6.* Louisiana, USA.
- Lindstedt, J. (1971) Chemical Control of Feeding Behavior. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.39A, pp:553-581.
- Ling, S.W. (1969) The General Biology and Development of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Proceedings of the World Scientific Conference on the Biology and Culture of Shrimps and Prawns.* Roma. pp: 589-606.

- Mackie, A.M. and R.G. Shelton (1972) A whole-animal bioassay for the determination of the food attractants of the lobster *Homarus gammarus*. *Marine Biology*. 14:217-221.
- Mackie, A.M. (1973) The Chemical Basis of Food Detection in the Lobster *Homarus gammarus*. *Mar. Biol.* 21: 103-108.
- Mackie, A.M. and J.W. Adron (1978) Identification of inosine and inosine 5'-monophosphate as the gustatory feeding stimulants for the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Comp. Biochem Physiol.* 60:79-83.
- Mackie, A.M. (1982) Identification of the gustatory feeding stimulants. In *Chemoreception in Fishes*. Edited by Toshiaki J. Hara. Elsevier Scientific Publishing Company. Canada. pp:228-240
- Mackie, A.M. and A.I. Mitchell (1985) Identification of gustatory feeding stimulants for Fish-Applications in Aquaculture. In *Nutrition and feeding in fish*. Edited by C.B.Cowey, A.M.Mackie & G. Bel. Academic Press. Great Britain. pp: 177-189.
- McLeese, D.W. (1970) Orientation of lobsters *Homarus americanus* to odor. *J. of the Fish. Res. Board of Canada*. 30: 838-840.
- Nordlund, D.A., Jones, R.L. and W.J. Lewis (1981) *Semiochemicals, their role in pest control*. Wiley Interscience Publication. New York, pp 306.
- Pearson, W.H., P.C. Sugarman, D.L. Woodruff and B.L. Olla (1979) Thresholds for detection and feeding in the dungeness crab, *Cancer magister* (Dana). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 39: 65-78..
- Peebles, J.B. (1977) A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 12: 173-180.
- Rittschof, D. (1990) Enzymatic production of small molecules attracting hermit crabs to stimulated gastropod predation sites. *J. Chem. Ecol.* 6(3):665-675.
- Rojas, J.C., E.A. Malo, A. Gutierrez and R.N. Ondarza (1990) Mating behavior of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 598-602.
- Sagy, A. and Z. Ra'anán (1985) Rapid identification of reproductive state and the receptive period of females in pond populations of *Macrobrachium rosenbergii*-A new technique. *Aquaculture*, 48:365-367.
- Shimizu, C., A. Ibrahim, T. Tokoro and Y. Shirakawa (1990) Feeding stimulation in sea bream, *Pagrus major*, fed diets supplemented with Antarctic krill meals. *Aquaculture*. 89: 43-53

- Smith, T.K. (1990) Effect of Dietary Putrescine on Whole Body Growth and Polyamine Metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194: 332-336.
- Steel, R. and J. Torrie (1980) Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. McGraw-Hill Book Co., New York, 633 pp.
- Susuki, S., K. Kobayashi and K. Takama (1994) Occurrence of biogenic amines at different processing stages of dried herring. *Fisheries Sciences.* 60:353-354.
- Takeda, M. and K. Takei (1992) Gustation and nutrition in fishes: application to aquaculture. In: *Fish Chemoreception*, T.J.Hara Ed. Chapman & Hall, London, England.
- Takei, M. (1977) Feeding behavior of crabs *Erimacrus isenbekii* and *Neptunus trituberculatus*. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 89:75-82.
- Tierney, A.J. and D.W. Dunham (1982) Chemical communication in the reproductive isolation of the crayfishes, *Orconectes propinquus* and *Orconectes virilis* (Decapoda, Cambaridae). *J. Crust. Biol.*, 2:544-548.
- Tierney, A.J. and J. Atema (1988) Behavioral responses of crayfish (*Orconectes virilis* and *Orconectes rusticus*) to chemical feeding stimulants. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 14, No.1, pp 123-133.
- Viana, M., M. Cervantes-Trujano and R. Solana-Sensores (1994) Attraction and palatability activities in juvenile abalone (*Haliotis fulgens*): nine ingredients used in artificial diets. *Aquaculture* 127:19-28.
- Voigt, R. and J. Atema (1992) Tuning of chemoreceptor cells of the second antenna of the American Lobster (*Homarus americanus*) with a comparison of four of its other chemoreceptor organs. *J. of Comparative Physiology A.* 171:673-683.
- Zar. J.H. (1984) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc. N.J. pp.345.
- Zimmer-Faust, R.K. (1987) Crustacean Chemical Perception: Towards a Theory on Optimal Chemoreception. *Biol. Bull.* 172:10-29.
- Zimmer-Faust, R.K. (1989) The relationship between chemoreception and foraging behavior in crustaceans. *Limnol. Oceanogr.*, 34(7): 1367-1374.

EVALUACION DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACION ORAL DE INMUNOESTIMULANTES EN LAS ENFERMEDADES DE ESPECIES PARA ACUACULTURA

Marleen Dehasque, Van Assche, J. y Devresse, B.

**Inve Aquaculture NV,
Oeverstraat 7, 9200 Baasrode, Belgium
Tel. (32.52) 33.13.20
Fax. (32.52) 33.45.31
E-mail: m.dehasque@inve.be**

Traducción: Ana C. Puello Cruz, Ravi Sangha y L. Elizabeth Cruz S.

RESUMEN

Durante los últimos años, el uso de los inmunoestimulantes ha ganado mayor interés como una valiosa alternativa al uso de antibióticos y vacunas en la lucha contra las enfermedades infecciosas de peces y camarones para cultivo.

Actualmente diversos productos se encuentran disponibles en el mercado, todos asegurando efectos positivos en la resistencia de las especies para acuicultura.

En este artículo se hace la comparación de diversas sustancias y su efecto con diferentes parámetros inmunológicos de sangre y supervivencia después de la infección bacteriana.

Se demostró que los resultados no siempre son consistentes; aun así la interpretación crítica es necesaria para la selección final de los productos más eficientes.

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas son aún la principal amenaza para el desarrollo exitoso de la industria de la acuicultura. La instalación de programas de manejo sanitario se vuelve cada vez más importante. Parte de estos programas involucra estrategias para prevenir las pérdidas por agentes infecciosos: prácticas básicas de buen manejo, quimio-terapia, vacunación, probióticos e inmunoestimulantes, todas las formas de actuar contra los invasores patógenos.

Las desventajas en el empleo de los antibióticos están bien descritas (creación de resistencias, efectos ambientales,... (Dixon, 1994). Una estrategia opuesta consiste en el uso de probióticos. Este campo resulta promisorio aunque aún se encuentra en fase experimental, pero comienza a tener un importante papel (Garriques y Arevalo, 1995). La vacunación ofrece la mejor prevención contra enfermedades específicas, pero todavía no existen vacunas efectivas contra un gran número de patógenos bacterianos y virales de importancia comercial. Aunado a esto, la vacunación no es aplicable a larvas o estadios tempranos de juveniles de peces y camarones los cuales tienen un sistema inmune poco desarrollado y depende de un sistema inmune no específico (Josefsson, 1993; Söderhall y Cerenius, 1992). En este respecto la aplicación de sustancias, mejoradoras de la resistencia no específica, esta tomando un papel muy importante en el control de enfermedades en la acuicultura. Aquí es donde la relación entre salud y nutrición se vuelve claro; el estado nutricional se considera uno de los factores importantes que determinan la habilidad de peces y camarones para resistir a infecciones. La deficiencia en ciertos nutrientes producirá problemas de salud, los animales enfermos requerirán dosis mayores determinados nutrientes para ser capaces de combatir la infección. Entonces, es un reto para la investigación en nutrición de camarón desarrollar dietas que produzcan entre otras cosas, una mejor resistencia a enfermedades. En este artículo una pequeña revisión de literatura presenta las diferentes sustancias que se sabe afectan las respuestas inmunológicas. La parte experimental presenta estudios en los cuales diferentes productos inmunoestimulantes son evaluados en diversas especies de larvas y en camarones y peces en crecimiento.

INCREMENTO EN LA INMUNIDAD POR LA INCORPORACION DE INMUNOESTIMULANTES EN EL ALIMENTO

Diversos artículos reportan el efecto de megadosis de vitamina C y E sobre el incremento de la inmunidad: Dietas con alto contenido en vitamina C incrementan la resistencia al estrés de postlarvas de *P. monodon* y *P. vannamei*. El pez plano (Turbot) y *P. vannamei* muestran mayor resistencia a infecciones con *Vibrio anguillarum* y *Vibrio harveyi* respectivamente (Kontara et al., 1996; Merchie et al., 1996a, 1996b). Waagb (et al. (1994) probaron diferentes niveles de 40 a 4000 ppm de vitamina C en el salmón del Atlántico, obteniendo incremento en la sobrevivencia después de infectarlos con *Aeromonas salmonicida*, incrementando la lisozima y la actividad de complemento con el nivel de 4000 ppm de vitamina C. En turbot los niveles de 2000 ppm de vitamina C incrementaron la lisozima del suero y la actividad fagocitosa del bazo (Roberts et al., 1995).

Existen reportes contradictorios sobre las dosis de vitamina E que influye en las respuestas inmunes: una deficiencia de vitamina E reduce la inmunidad celular y humoral de la trucha arcoiris pero no del salmón del Atlántico y salmón Chinook (Lall y Olivier, 1993). Blazer (1992) probó niveles entre 7 y 800 ppm en la resistencia a enfermedades del salmón del Atlántico demostrando que solo los niveles más bajos producen mortalidad después de la infección y promueven la actividad complementaria.

Los efectos y requerimientos dependen de los lípidos y los niveles de HUFA en las dietas. El posible papel de la astaxantina ha sido demostrado por Verlhac et al. (1996) en la trucha arcoiris, con niveles de 50 a 400 ppm, se mejoró la fagocitosis.

Los inmunostimulantes por definición son químicos, drogas, estresantes o acciones que elevan el mecanismo de las defensas no específicas o la respuesta inmuno-específica (Anderson, 1992). Una revisión de todos los posibles inmunostimulantes, adyuvantes y vacunas empleados actualmente en la acuicultura son descritos por Anderson (1992).

Devresse *et al.* (1996) revisa los productos disponibles en el mercado. Los glucanos son probablemente el grupo más popular de los inmunostimulantes, si se considera la disponibilidad en el mercado. Estos polisacáridos, compuestos por enlaces b-1.3 y b-1.6 forman parte de la pared celular de las levaduras y hongos. Los glucanos han sido usados en diferentes estudios sobre la respuesta inmune en peces y camarones. La mayoría de los artículos tratan sin embargo, con la administración por inyección, frecuentemente como un adyuvante para mejorar la eficacia de la vacunación (Chen y Ainsworth, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993, Rorstad *et al.*, 1993). La administración oral es menos descrita (Yoshida *et al.*, 1995; Skjermo *et al.*, 1995). La mayoría de las publicaciones también trata con adultos de Salmonidos. Aunque existen algunas publicaciones sobre la aplicación en camarón, estas son limitadas (Sung *et al.*, 1994; Newman, 1995). Por estas últimas razones, este artículo describe experimentos que han sido realizados con algunas especies de peces y camarones marinos. Debido a la poca información disponible sobre respuestas inmunológicas no específicas de los primeros estadios, también fueron realizados experimentos con larvas.

EXPERIMENTOS CON CAMARONES PENEIDOS

1. ESTADIO LARVAL

Larvas de *P. indicus* fueron cultivadas en frascos de 10 litros (temperatura 29°C, salinidad 32 ppt) desde PZ1 usando dos tratamientos: 50% alimento vivo (10 células/ml *Tetraselmis*, 20 células/ml *Skeletonema*) más 50% de una de las dos dietas (4mg/litro). Ambos alimentos fueron hechos con una dieta estándar para larvas (Lansy ZM-INVE Bélgica) suplementada o no con una mezcla de inmunostimulantes seleccionados (+IS). Al alcanzar el estadio PZ3, las larvas fueron transferidas a matraces de 2 litros (12 matraces, 100 ind./matraz, con seis matraces réplica cada tratamiento). Por cada tratamiento 3 matraces fueron inoculados con bacterias (*Vibrio harveyi* BP04), permaneciendo tres tratamientos control. Después de 48h de la introducción de la bacteria, todos los matraces fueron muestreados haciendo un conteo de las larvas sobrevivientes.

Los resultados se muestran en la Figura 1. La sobrevivencia en las larvas no infectadas fue ligeramente superior en los animales alimentados con el inmunostimulante aunque no significativamente (90% contra 80%). Sin embargo, en las larvas infectadas, la sobrevivencia se redujo a 54% y 13% en las larvas alimentadas con inmunostimulante y las larvas alimentadas con la dieta control respectivamente.

A pesar de la alta variabilidad entre réplicas, la sobrevivencia tras la infección bacteriana fue mayor en los tratamientos de las larvas alimentadas con dietas con inmunostimulantes.

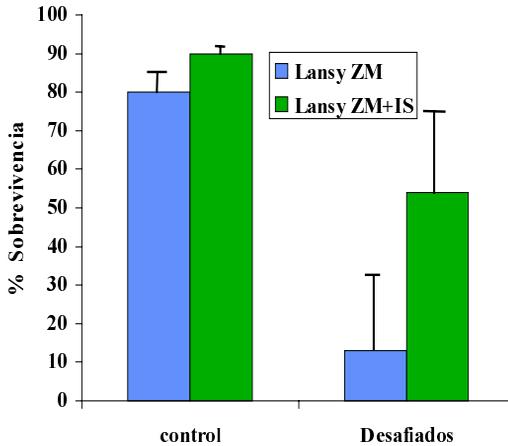


Figura 1. Sobrevivencia de larvas de camarones peneidos después de ser sometidas a un desafío con *Vibrio harveyi*

2. ESTADIO POSTLARVAL

- A. Stresspak (INVE, Bélgica) es una vitamina y fortificante antiestresante para camarón. Esta dieta contiene niveles altos de vitamina C y E, y es empleada como suplemento parcial de la ración alimenticia.

El propósito de la dieta es fortificar al camarón antes y después de la siembra en estanques, así mismo, una fortificación semanal es recomendada para prevenir debilitamiento del animal por diversos factores estresantes.

Postlarvas de *P. indicus* fueron cultivadas a lo largo de sus diferentes estadios, con una dieta viva. Las postlarvas PL fueron sembradas a una densidad de 4 PL/l en contenedores plásticos de 5l con agua marina filtrada (5 mm) (salinidad 33 g/l, temperatura 27.5o C, pH 8.1). Los recipientes fueron parcialmente sumergidos en baño María con calentador con termostato. El primer día después de la siembra, se hizo un recambio de agua del 50% y después un recambio del 100% cada tercer día. Una piedra aereadora abasteció el cultivo con aereación ligera. Se evaluaron tres tratamientos con tres replicas. FP+150 Ultra (INVE AQUACULTURE nv, Bélgica), fue usado como dieta control y comparado con la misma dieta substituida parcialmente (30 y 50%) con Stresspak. Los camarones fueron alimentados ad libitum dos veces al día,

después de sifonear las heces y alimento no consumido. Los camarones fueron cultivados por 14 días. La sobrevivencia y el crecimiento (medición longitudinal) fueron monitoreados cada tercer día.

Los resultados obtenidos de sobrevivencia y crecimiento se presentan en las Figuras 2 y 3 respectivamente.

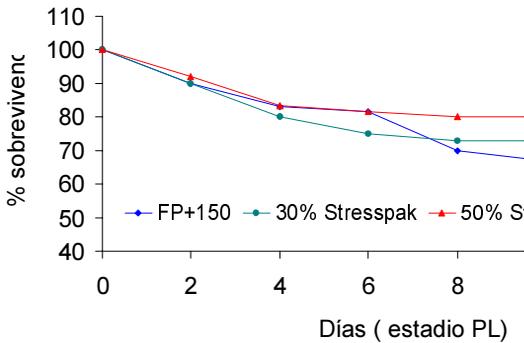


Figura 2. Sobrevivencia de postlarvas de *P. indicus* durante 2 semanas de alimentación con Frippak+150 ultra parcialmente reemplazado por Stresspak

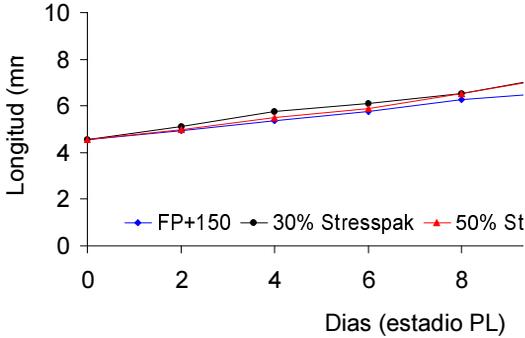


Figura 3. Crecimiento de postlarvas de *P. indicus* durante 2 semanas de alimentación con Frpak+150 parcialmente reemplazado por Stresspak

En el estadio PL15, un reemplazo de FP+150 en un 50% mostró un incremento significativo en sobrevivencia y crecimiento comparado con el control, mientras que una sustitución de 30% dio resultados intermedios. El crecimiento fue similar en los tres grupos hasta el sexto día; del octavo en adelante ambos grupos de Stresspak demostraron un crecimiento más rápido que el control.

- B. Para los animales demasiado jóvenes para ingerir dietas artificiales, un nuevo producto microencapsulado (Dry Immune Selco, INVE Bélgica) ha sido desarrollado para incrementar la resistencia a enfermedades y estrés mediante el enriquecimiento de rotíferos *Artemia*. Esta dieta igualmente es rica en diversos inmunoestimulantes, entre ellos vitamina C y E. Igualmente el propósito es fortificar a las postlarvas de camarón justo antes y después de sembrar en los estanques. El experimento fue realizado a escala de producción: Postlarvas PL10 fueron sembradas a la densidad de 100 PL/l en tanques de 8 m³ con agua marina filtrada (salinidad 25 ppt, 30o C). Fueron alimentados con *Artemia* no enriquecida (control) y *Artemia* enriquecida con DIS por 5 días, de PL11 en adelante. La resistencia al estrés fue monitoreado diariamente con un shock de salinidad.

Después de 24 horas de la primera alimentación el efecto del DIS es claramente observado en las gráficas de mortalidad (Figura 4): 20 % en los grupos enriquecidos con DIS contra 90 % en aquellos grupos no enriquecidos.

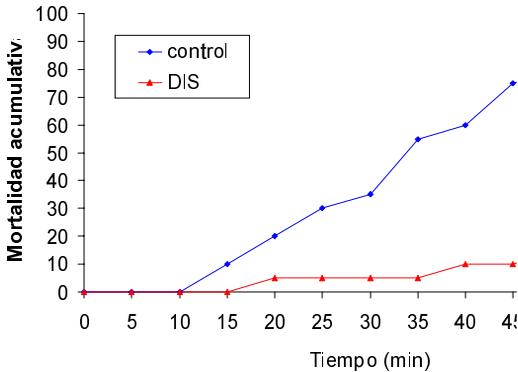


Figura 4. Mortalidad acumulada de *P. monodon* (PL12) después de un shock de salinidad a 0 ppt alimentados con *Artemia* enriquecida con DIS

EXPERIMENTOS EN PECES

1. ESTADIOS LARVALES Y JUVENILES

- A El mismo producto enriquecedor DIS fue evaluado en larvas de peces. Larvas de 28 días fueron distribuidas en tanques de 30 l a densidades de 45 peces/tanque en un sistema de recirculación (salinidad 30ppt, 22o C). Los peces fueron alimentados con *Artemia* enriquecida con DIS contra *Artemias* enriquecidas con Selco durante 10 días. Después fueron infectados por inmersión en una suspensión de 8×10^4 *Vibrio anguillarum*/ml. Un control no infectado fue sumergido en agua del cultivo bajo condiciones similares. La sobrevivencia de ambos, peces infectados y no infectados, fue monitoreada por una semana.

En la Figura 5 se presenta la sobrevivencia 7 días después de la infección. En ambos grupos de no infectados la sobrevivencia era cercana al 100%. Los peces infectados alimentados con *Artemia* enriquecida con DIS sobrevivieron la exposición al patógeno mejor que el control, sin embargo, la variabilidad entre replicas fue bastante alta.

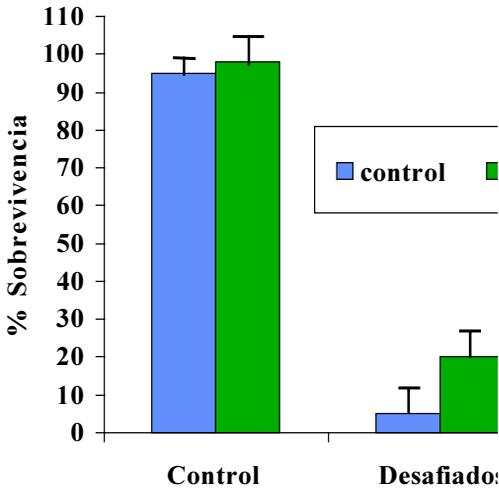


Figura 5. Supervivencia de alevines de “turbot” alimentados con Artemia enriquecida con DIS una semana después del desafío bacteriano

- B Una dieta enriquecida con vitaminas (Lansy Dynamic, INVE, Bélgica), similar a Stresspak ha sido desarrollada para peces. Cabrillas europeas de 70 días, fueron alimentadas por una semana con dietas estándar para larvas (Epac, INVE, Bélgica), remplazada o no con 50% de Lansy Dynamic. Después se infecto con inmersiones de una suspensión de 6×10^6 *Vibrio anguillarum*/ml. La supervivencia se monitoreo después de una semana. Los peces alimentados parcialmente con Lansy Dynamic sobrevivieron la infección bacteriana mejor que el control, aunque la variabilidad en los mismos tratamientos fue alta (Figura 6).

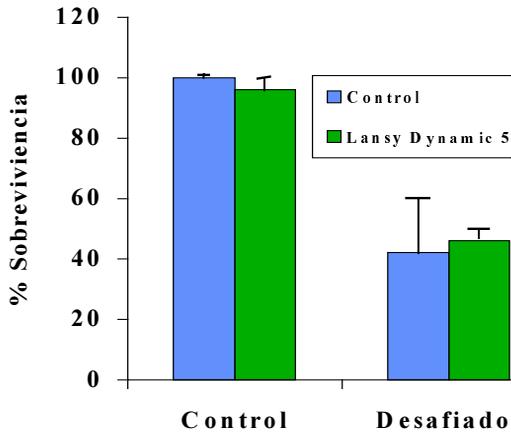


Figura 6. Sobreviviencia de alevines de sea bass europeo después de un desafío con *Vibrio anguillarum*

2. ESTADIOS LARVALES: EVALUACION DE INMUNOESTIMULANTES COMERCIALES

Debido a la gran cantidad de productos en el mercado, no resulta claro para el formulador de dietas balanceadas cual elegir. El propósito del siguiente experimento fue comparar diversas sustancias comerciales en diferentes especies para finalmente seleccionar los productos con los mejores resultados para proponerlas bajo la forma de premezclas formuladas.

- A Cabrillas europeas con peso promedio de 8 g fueron confinadas en tanques de 500 L y alimentadas por 9 semanas con 4 diferentes dietas: una dieta control y tres dietas experimentales cada una de ellas conteniendo diferentes derivados de levadura. Una proporción de los peces fueron infectados con *Vibrio anguillarum*, y la otra parte se empleó para muestreo de sangre y determinar la actividad lisozímica. Mortandades acumuladas después de una semana de la infección se observan en la Figura 7 y los valores de la actividad de la lisozima en la Figura 8. Solo un producto suministrado dio mejor protección después de la infección (producto experimental INVE). Tanto el inmunoestimulante A como el producto experimental INVE dieron niveles de lisozima más altos que el control, en estos resultados no hubo evidente correlación entre ambos criterios. La variabilidad nuevamente fue alta en los resultados de lisozima, lo cual dificulta la representación de una conclusión final en la prueba.

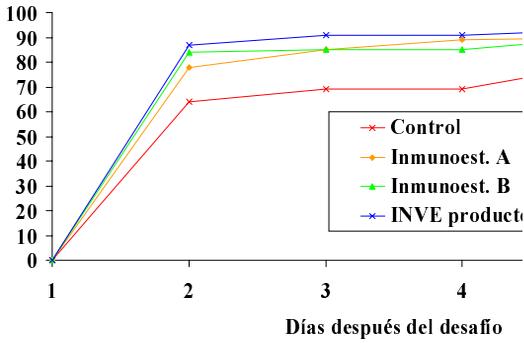


Figura 7. Mortalidad acumulada en sea bass alimentados con diferentes inmunoestimulantes durante una semana después del desafío

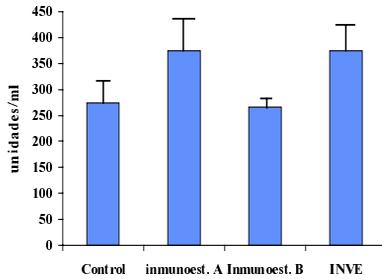


Figura 8. Actividad lisozima de sea bass después de un periodo de alimentación de 2 meses con diferentes inmunoestimulantes

Figura 8. Actividad lisozima de sea bass después de un periodo de alimentación de 2 meses con diferentes inmunoestimulantes

B Larvas de salmón del Atlántico fueron alimentadas desde su primera alimentación con 8 diferentes dietas durante 6 semanas. Una dieta control fue comparada con 4 dietas conteniendo cada una diferentes productos de levadura y otras 3 dietas conteniendo diferentes fuentes de glucano. La infección experimental se realizó con *Vibrio anguillarum* y la sobrevivencia se monitoreo una semana después. La sobrevivencia final de ambas series se presenta en las Figuras 9 y 10. En el tratamiento control se observó 20% de sobrevivencia mientras que en el blanco (peces no infectados) se observó una sobrevivencia del 93%. La sobrevivencia en los tratamientos con levadura variaron de 65 y 83%. La levadura fresca mejoró la sobrevivencia significativamente (56.4% contra 22.8% del control). Resultados semejantes fueron obtenidos con levaduras comerciales secas (pl. levadura , 62.2%). En los otros dos tratamientos en los cuales se trato químicamente la levadura fresca, el tratamiento mas fuerte (levadura tr2) resultó con la mayor sobrevivencia (83%). La sobrevivencia en los tratamientos con glucano varió entre 30 y 80%, con la mayor sobrevivencia en los peces alimentados con glucano proveniente de hongos. El glucano proveniente de cebada no tuvo efecto en la resistencia de la enfermedad (cadenas de glucosa con carencia de b-1.3).

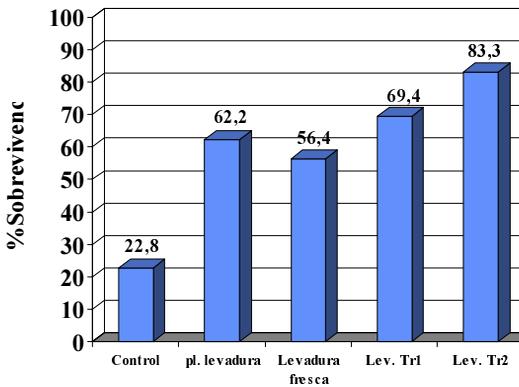


Figura 9. Sobrevivencia de alevines de salmón del Atlántico alimentados con diferentes productos a base de levadura, una semana después de desafío

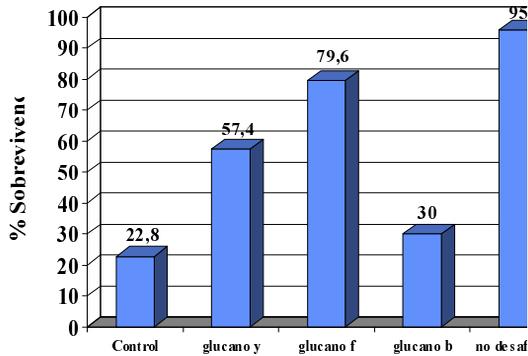


Figura 10. Supervivencia de alevines de salmón del Atlántico alimentados con diferentes productos a base de glucanos, una semana después de desafío

C Truchas arcoiris (200g) fueron alimentadas con dietas que contenían diferentes inmunoestimulantes comerciales durante 4 semanas. Cada pez fue marcado individualmente y por grupo. 2x7 peces fueron monitoreados individualmente muestreando sangre al comienzo, después de 2 y 4 semanas. De esta manera la variabilidad interindividual podría controlarse. Los parámetros inmunológicos de la sangre probados fueron la actividad lisozima en el suero, valores de NBT (Nitroblue Tetrazolium), hematocrito y leucocrito.

En la Figura 11 se presenta la diferencia porcentual de la actividad lisozima (unidades/ml) entre el principio y final de la prueba. La actividad lisozima del control y de los tratamientos Ea permaneció bastante constante, demostrando que no hubo ninguna activación del sistema inmunológico, respecto a este parámetro. Por otro lado, los tratamientos A y Eb mostraron un incremento en la actividad lisozima, sin embargo, los resultados fueron enmascarados por una enorme variación estándar: los valores presentados son promedios de 7 valores por grupo. La Figura 12 muestra valores de NBT para los diferentes tratamientos en función del tiempo. La caída después de 2 semanas fue correlacionada con la ruptura de una bomba de agua del sistema experimental. Los peces se estresaron, lo cual se reflejó inmediatamente en el sistema inmunológico. Esto cuestiona la metodología regular para toma de sangre; el estrés provocado por esta manipulación influirá las respuestas inmunológicas y enmascarará los efectos por diferentes tratamientos. Por esa razón, un experimento similar se realizó en donde la muestra de sangre fue tomada al final del experimento y se comparó con los valores de NBT entre los tratamientos después de un período de alimentación de 3 semanas; esos resultados se muestran en la Figura 13. Comparados con el control, ambos tratamientos A y Eb tienen altos valores de

NBT, aunque la variabilidad entre tratamientos iguales fue nuevamente significativa (valor promedio de 20 peces). Los valores de hematocrito (en porciento) para cada tratamiento al comienzo y final de la prueba se presentan en la Figura 14. Este parámetro fue medido para determinar la influencia de muestreos repetitivos sobre el pool de células sanguíneas y el sistema inmunológico de los peces. Los valores permanecieron más bien estables, indicando que los peces poseen la habilidad de regenerar su pool de células rojas muy rápido. Sin embargo, los niveles de leucocitos (Figura 15) disminuyeron significativamente para todos los tratamientos excepto el tratamiento Eb, indicando que los peces no regeneraron su pool de las células blancas sanguíneas. Al tomar muestras de sangre a intervalos regulares el sistema inmunológico de peces fue lastimado, lo cual cuestiona esta metodología para valorar los efectos de diferentes inmunostimulantes.

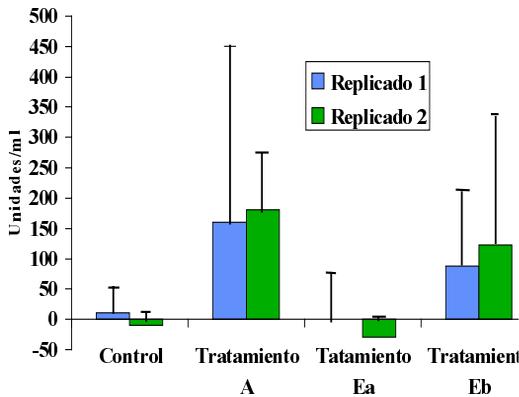


Figura 11. Diferencia porcentual de actividad lisozima (unidades/ml) entre el final y el comienzo de un período de alimentación (4 semanas) en suero de trucha arcoiris alimentada con diferentes inmunostimulantes.

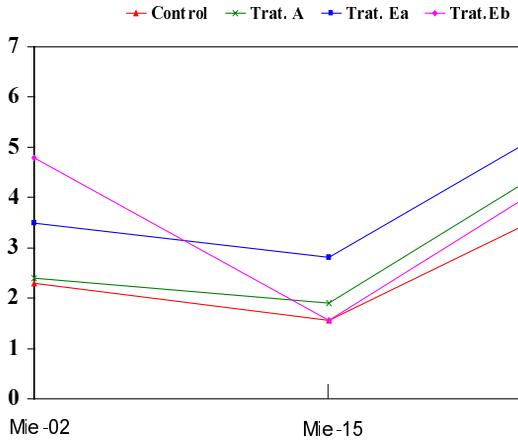


Figura 12. Niveles de NBT en suero de trucha arcoiris alimentada con diferentes inmunoestimulantes en función del tiempo

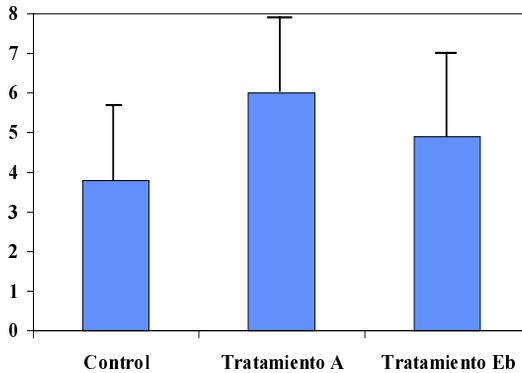


Figura 13. Niveles de NBT en suero de trucha arcoiris después de tres semanas de alimentación con diferentes inmunoestimulantes

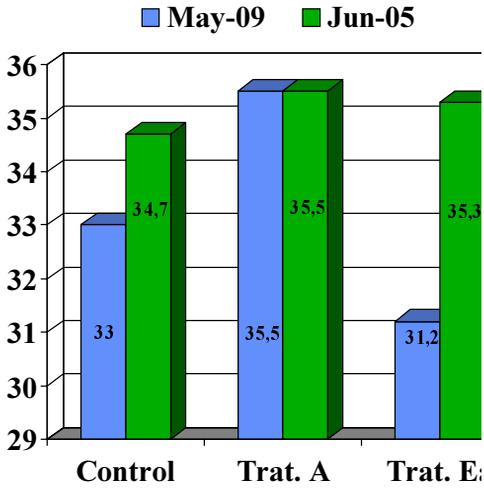


Figura 14. Nivel de hematocrito de truchas arcoiris alimentadas con diferentes glucanos comerciales (al inicio y al final del experimento)

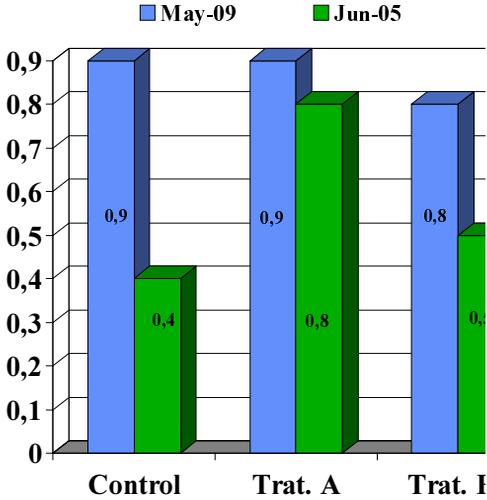


Figura 15. Nivel de leucocitos en truchas arcoiris alimentadas con diferentes glucanos comerciales (al inicio y al final del experimento)

La Figura 16 presenta la relación neutrófilo:linfocitos por cada tratamiento. En todos los tratamientos esta relación disminuyó abruptamente después de 2 semanas. Esto es probablemente debido a una limfopenia aumentada. Posiblemente los peces estresados aumentaron su concentración de cortisol lo que afectó esta relación. Estos resultados confirman nuevamente la influencia de los muestreos sanguíneos en los parámetros inmunológicos.

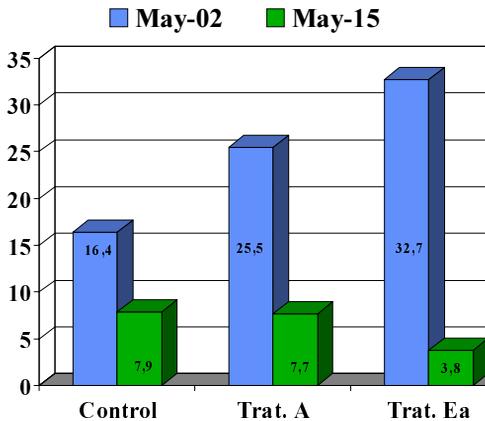


Figura 16. Relación de linfocitos:neutrófilos de truchas arcoiris alimentadas con diferentes glucanos comerciales (al inicio y al final del experimento)

CONCLUSIONES

Es posible aumentar la resistencia al estrés y/o infección bacteriana en larvas de peces y camarones por administración vía oral de inmunoestimulantes. Por medio del enriquecimiento de alimento vivo o por reemplazo parcial de dietas artificiales respectivamente con emulsiones o dietas secas enriquecidas con sustancias inmunoestimulantes, se puede incrementar la sobrevivencia de larvas de peces y camarones después de una infección bacteriana. Para fortalecer postlarvas de camarón antes y después del confinamiento en estanques y para permitir condiciones óptimas en larvas de peces antes de la clasificación y transporte el mismo principio puede aplicarse.

Los tres ensayos en donde diferentes inmunoestimulantes fueron evaluados a la vez 'in vivo' e 'in vitro' mostraron que:

- Los efectos difieren entre tratamientos, llevando a la selección del producto más eficiente.

- No se demostró una clara relación entre los parámetros inmunológicos de la sangre y la resistencia a un patógeno mostrada por medio de una infección experimental.
- Simples productos de levadura están actuando de manera similar a algunos glucanos
- Existe una alta variabilidad dentro de un mismo tratamiento debido a una significativa heterogeneidad inter-individual, claramente demostrada en los valores de lisozima y NBT
- Los peces se estresan muy fácilmente lo cual afecta el sistema inmunológico.
- Muestrear sangre del mismo pez afecta su sistema inmunológico e interfiere con el efecto de los inmunostimulantes.
- Una infección experimental es de cualquier modo necesaria para completar las pruebas sanguíneas

Todos estos fenómenos demuestran que la evaluación de los inmunostimulantes no es tan evidente. En tales bioensayos una alta variabilidad es inevitable y por lo tanto es de la mayor importancia, elegir el sistema y diseño experimental adecuado. Antes de hacer una conclusión final de este tipo de experimentos, es necesaria una interpretación crítica de las condiciones y de los resultados de la prueba.

LITERATURA

- Anderson, (1992). Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annual Rev. of Fish Diseases*: 281-307.
- Blazer, V.S. (1992). Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Rev. of Fish diseases*, 309-323.
- Chen, D. and Ainsworth A.J. (1992). Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.* 15:295-304.
- Devresse, B., Dehasque, M., Van Assche, J. and Merchie, G. (1996). Nutrition and Health. In *Proceedings of the Workshop on Fish Nutrition "Feeding Tomorrow's Fish"*, Mazzaron, Murcia, Spain, June 1996, in press.
- Dixon, B.A. (1994). Antibiotic resistance in bacterial fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25, 136-139.
- Garrigues, D. and Arevalo, G. (1995). An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In *Swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming*. Browdy, C.L. and Hopkins, J.S (eds.). The world Aquaculture Society, San Diego, February 1995. p. 53-59.
- Jørgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B. (1993). Peritoneal and head kidney cell response to

- intraperitoneally injected levadura glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 16:313-325.
- Joseffson, S., Tatner, M.F. (1993) Histogenesis of the lymphoid organs in seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 3, 35-49.
- Kontara, E.K., Merchie, G., Lavens, P., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P. (1996). Improved larviculture outputs of postlarval shrimp *Penaeus vannamei* through supplementation of l-ascorbyl-2-polyphosphate in the diet. *Aquaculture International*, in press.
- Lall, S.P. and Olivier, G. (1993). Role of micronutrients in immuneresponse and disease resistance in fish. In *Fish nutrition in practice*, INRA (ed.). Les Colloques, N61, Paris, pp. 101-118.
- Merchie, G., Lavens, P., Dhert, Ph., Gómez, M.G.U., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P. (1996a). Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *J. Fish Biol.*, in press.
- Merchie, G., Lavens, P., Kontara, E., Ramos, X., Leon-Hing Kujan, A., Van Hauwaert, A., Pedrazzoli, A., Naessens-Foucquaert, E., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgeloos, P. (1996b). Supplementation of ascorbic acid
- Newman, S. G. (1995). Enhanced survival of penaeids exposed to lipopolysaccharides. In *Book of abstracts of the 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society*, Bangkok, Thailand. LeRoy Crerswell, R. (ed), Ft. Pierce, Florida, pp. 280-281.
- Roberts, M.L., Davies, S.J. and Pulsford, A.L. (1995). The influence of ascorbic acid on non specific immunity in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 5:27-38.
- Rrstad, G., Aasjord, P.M. and Robertsen, B. (1993). Adjuvant effect of a levadura glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 3: 179-190.
- Skjermo, J., Defoort, T., Dehasque, M., Espevik, T., Olsen, Y., Skj(k-Br(k, G., Sorgeloos, P. and Vadstein, O. (1995). Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism *Artemia*. *Fish & Shellfish Immunology* 5: 531-534.
- Söderhall, K. and Cerenius, L. (1992). Crustacean Immunity. *Annual review of fish diseases*, 3-23.
- Sung, H.H., Kou, G.H. and Song, Y.L. (1994). Vibriosis resistance induced by glucan treatment in Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, 29 (1), 11-17.
- Verlhac, V., Gabaudan, J. and Schielre, J. (1996). Influence of astaxanthin on non-specific

immuneresponse of rainbow trout. In Book of abstracts of the 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society, Bangkok, Thailand. LeRoy Creswell, R. (ed), Ft. Pierce, Florida, pp. 426.

Waagbo, R., Glette, J., Sandnes, K. and Hemre, G.I. (1994). Influence of dietary carbohydrate on blood chemistry, immunity and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 17:245-258.

Yoshida, T., Kruger, R. and Inglis, V. (1995). Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.*, 18: 195-198.

RESUMEN DE LA EVALUACION SOBRE LA UTILIZACION DE ASTAXANTINA EN NUTRICION DE CAMARONES

José Ignacio Arango G.

Roche Ecuador S.A.
Ave. 10 de Agosto 5133 y NNUU
Casilla 1711-06185 Quito, Ecuador
Tels. (5932) 465 210/464 934
Fax. (5932) 439 638
E-mail: josei.arango@roche.com

INTRODUCCION

En la última década se observa un incremento sustancial en el número de trabajos científicos publicados en nutrición de camarones, enfocados a determinar los requerimientos de los principales nutrientes en las diferentes especies y fases de producción. Dentro de esta área, en los últimos cinco años, varios trabajos han sido publicados evaluando el uso de un carotenoide (astaxantina), ya sea como pigmentante o como un nutriente en diferentes especies de *Penaeus*. (Arango G. 1993, Arango et al. 1994, 1995, Chien y Jeng 1992, High 1995, Kurmaly 1993, 1994, 1995, Kurmaly y Latscha 1993, Latscha 1989, 1991, 1991A, Menasveta 1993, Menasveta et al. 1993, Miki 1991, Negre-Sadargues G 1993, Pedraza et al. 1996 y Yamada et al. 1990).

Los crustáceos silvestres son considerados particularmente ricos en carotenoides. La concentración de carotenoides totales encontradas en diferentes especies de camarones varía desde 50 mg/kg hasta 500 mg/kg de tejido, y en algunos estados larvales se reportan concentraciones hasta de 800 mg/kg. de tejido. Dentro de los carotenoides totales, una amplia gama de estos han sido identificados, no en tanto, el más importante en crustáceos es la Astaxantina (Latscha 1989).

Los crustáceos son incapaces de sintetizar la Astaxantina, por lo cual, dependen de una adecuada ingestión. En el caso particular de los camarones, son capaces de oxidar y convertir el b-caroteno, la zeaxantina y otros pigmentos intermedios en Astaxantina. Sin embargo, la proporción molecular necesaria de cada uno de los carotenoides para obtener una molécula de Astaxantina es extremadamente alta, por lo cual es un proceso metabólico altamente ineficiente (Latscha, 1989 y 1991).

La Astaxantina es un oxycarotenoide derivado del b-caroteno, y consiste de una larga cadena de carbonos poli-insaturada con grupos funcionales tanto al inicio como al final de la cadena. En la naturaleza se presenta como una mezcla de tres isómeros ópticos denominados 3S,3'S; 3S,3'R y 3R,3'R, los cuales son responsables por cerca del 65% al 90% del total de carotenoides presentes en el cuerpo de los crustáceos (Latscha 1989).

En los crustáceos, la pigmentación es debido a la presencia de la Astaxantina en el caparazón o exoesqueleto y la hipodermis. En estos dos tejidos, en asociación con el hepatopáncreas, se deposita entre el 58% al 90% de toda la Astaxantina depositada en el cuerpo.(Latscha 1991).

Según Chien y Jeng (1992), del total de Astaxantina depositada en el cuerpo de *P. monodon*, aproximadamente el 45% esta presente en la cabeza, la cual incluye el hepatopáncreas, el 28% en el caparazón y el 24% en la cola.

En el caso específico del *P. vannamei*, aproximadamente el 65 % del total de carotenoides depositados en el cuerpo es Astaxantina, el 5% es el 7,8 dihidroastaxantina y el 30% una mezcla de varios carotenoides.

La Astaxantina en crustáceos esta presente en tres diferentes formas: la primera, en forma libre. Esto es, sin esterificar la forma oxycarotenoidea. Segunda, la forma esterificada. La cual puede estar esterificada con una o dos cadenas largas de ácidos grasos, tales como: ácido palmítico, oleico, estearico y linoleico; y la Tercera, Astaxantina libre o esterificada asociada a proteínas, tales como, carotenoproteínas y carotenolipoproteínas. Esta asociación con proteínas es responsable por el color característico de los crustáceos. Las formas esteres generalmente representan la gran mayoría de la Astaxantina depositada en los tejidos (Latscha, 1989).

Varias funciones fenológicas y/o fisiológicas han sido reportadas en la literatura para los carotenoides en especies acuícolas, en nuestro caso específico, la Astaxantina. Fenológicas, tales como: comunicación entre organismos, camuflaje, reproducción y fisiológicas como: protección de membranas celulares, antioxidante intracelular, mejoramiento de respuesta inmunológica no específica y reserva de oxígeno intracelular. (Bendich 1989, Chien y Jeng 1992., Estermann 1994., Goodwing 1986., Kurashige 1993., Kurmaly 1993, 1994, 1995., Kurmaly y Guo 1995., Kurmaly y Latscha 1993, Latscha 1989, Menasveta 1993, Menasveta et al. 1993 y Miki 1991, Prabhal et al... 1989).

Estudios fisiológicos han demostrado que la Astaxantina en camarones incrementa la tolerancia al estrés, mejora la respuesta inmune, estabiliza la pared celular, puede ser una reserva intracelular de oxígeno y cumple la función como protector intracelular al quelatar los radicales libres (Menasveta 1993).

Según Miki (1991), la Astaxantina por naturaleza, tiene la habilidad de quelatar sustancias tóxicas, protegiendo el ambiente intracelular de los organismos. Bajo condiciones normales, el metabolismo celular produce rutinariamente productos tóxicos tales como: peróxido, radicales libres y otros productos fruto de la oxidación celular. Los cuales, a menos que sean quelatados,

afectarán las estructuras químicas de las organelos celulares. La potencia de la Astaxantina como quelatador de radicales libres, en último término antioxidante, es aproximadamente 2500 veces la potencia de la vitamina E. Vitamina conocida como el mayor antioxidante intracelular. Esto coloca a la Astaxantina como el mayor antioxidante celular en crustáceos.

Para Kurashige et al. (1990) citado por Meyers S., (1994), la Astaxantina protege las membranas celulares del proceso oxidativo, por inhibición de la peroxidación lipídica mitocondrial, lo cual reafirma su enorme capacidad como antioxidante biológico. Además, la información existente nos indica que, la Astaxantina es capaz de funcionar como donador de oxígeno en ambientes donde la presión parcial de oxígeno es extremadamente baja; por ejemplo, en el huevo, en células con rápido crecimiento y en piscinas con alta concentración de sedimentos (Menasveta 1993). Esto permite a las células y los tejidos de crustáceos, en nuestro caso específico en camarones existir, sobrevivir y tener un óptimo desarrollo en ambientes con características estresantes (Chien y Jeng 1992).

Según Menasveta (1993), Bendich (1989) y Prabhal et al. (1989) la formación de complejos caroteno-proteínas y caroteno-lipo-proteínas de alta densidad, permiten que los carotenoides y la Astaxantina, influyan positivamente en la estabilidad de la membrana celular, en las reacciones intracelulares que aumente la respuesta inmunológica de los animales, tanto específica como no específica.

En condiciones prácticas los crustáceos están sometidos a continuos procesos de estrés, fundamentalmente debido a cambios en el medio ambiente, como: temperatura, salinidad, nivel de oxígeno, fluctuación de pH, incremento del amonio, producción de nitritos, nitratos y presencia de otros poluentes.

Bajo estas circunstancias los crustáceos, y en nuestro caso específico, los camarones, tiene tres rutas fisiológicas por escoger dependiendo del tamaño del estrés y el estado nutricional de éstos. La primera, es adaptarse y controlar fisiológicamente los efectos del estrés; la segunda, es modificar algunos procesos fisiológicos que permitan sobrevivir ante la presencia del estrés y la tercera, es sucumbir ante el estrés, al no adaptarse a éste efecto externo.

En el organismo existe una gama de nutrientes, los cuales, son utilizados para combatir el desbalance fisiológico generado por el estrés y la Astaxantina es uno de los principales.

Kurmaly y Guo (1995), evaluaron el efecto de diferentes tipos de estrés, ya sea, alta concentración de amonio, bajo oxígeno disuelto y baja temperatura, en la movilización de Astaxantina en el cuerpo de camarones, *Penaeus monodon*. Estos camarones fueron alimentados previamente con altas dosis de Astaxantina por espacio de seis (6) días para garantizar niveles altos de depósito en el cuerpo. Los autores reportaron una disminución significativa en el depósito de Astaxantina en el cuerpo, hepatopáncreas y ojo de camarones, después de ser sometidos a estrés por baja temperatura y bajo oxígeno disuelto en el medio. No se observó efecto significativo de las altas concentraciones de amonio.

Actualmente, existen fuertes evidencias científicas, las cuales nos permiten afirmar que la Astaxantina es un nutriente esencial para la maduración de camarones (High, 1995), para mejorar la producción (Arango et al.1994, Arango et al. 1995., Chien y Jeng 1992., Kurmaly 1993, 1994, 1995., Kurmaly y Latscha 1993., Latscha 1992., Menasveta 1993., Pedraza et al. 1996 y Yamada et al. 1990) y es el carotenoide específico para mejorar la pigmentación de los camarones (Arango 1993., Chien y Jeng 1992., Latscha 1989., 1991 y 1991A, Menasveta et al. 1993 y Yamada et al. 1990).

High (1995), evaluó en el sistema de maduración de la compañía Playaespec S.A. del grupo Langostinos Ecuatorianos, Lanec S.A. el uso de astaxantina (213 ppm del total de materia seca ofrecida por día) en doce (12) tanques de cemento forrados con plásticos de PVC negro. La profundidad del agua fue de 30 cm, el recambio diario de 200% y la temperatura del agua entre 27 a 29°C. Fueron usadas reproductoras pescadas en la zona de San Pablo, Provincia del Guayas, Ecuador. Durante el mes y medio que duró la prueba se tuvo producción de nauplii en tres periodos de dos días cada uno. Las hembras eran inseminadas artificialmente y después del desove devueltas a sus tanques de origen. En esta evaluación se encontró diferencia significativa ($P \hat{=} 0.005$) en la frecuencia de desoves por día de hembras, *Penaeus vannamei*, alimentadas con astaxantina comparadas a camarones hembras control alimentadas sin Astaxantina. No se observó diferencia significativa ($P \hat{=} 0.05$) en producción de nauplii por desove y sobrevivencia de los nauplii. El número de nauplii por desove fue severamente afectado por variación en el nivel de fertilización de los huevos, asociado a las condiciones de los machos usados para la inseminación y en particular a su tiempo de almacenamiento. Aunque hubo más nauplii por desove en las camarones hembras recibiendo en su dieta Astaxantina, la variación en el nivel de fertilización no permitió encontrar diferencias significativas en éste factor.

Según High (1995), puede ser que el éxito de la astaxantina en este ensayo fue proveer un ingrediente en forma rápida para la segunda fase de formación de la yema del huevo y el ensamblaje del complejo carotenolipoproteico llamado lipovitelina.

En estudios de producción, inicialmente en laboratorio, Yamada et al. 1990, encontraron una mejora sustancial en la sobrevivencia, cuando camarones *P. monodon* fueron alimentados con 50 ppm de astaxantina (90%) comparados al control (57%). Estudios adicionales, Chien y Jeng (1992), reportaron un incremento en la sobrevivencia, superior al 30% y un mejor crecimiento de *P. japonicus* suplementados con 50 ppm de Astaxantina.

Los resultados iniciales de laboratorio han sido confirmados por ensayos bajo condiciones prácticas tanto en Tailandia, Indonesia, Colombia y Ecuador, ya sea con *P. monodon*, *P. japonicus* o *P. vannamei*.

Kurmaly (1993, 1994 y 1995), Kurmaly y Latscha (1993) y Menasveta (1993) evaluaron y confirmaron los beneficios de la Astaxantina en producción de camarones en Asia. La inclusión de Astaxantina (50 ppm) en alimento para camarones, *P. monodon*, mejoró significativamente la sobrevivencia, entre un 9% a un 25%; incrementó el total de libras cosechadas, entre un 23% al 30%; redujo entre un 8% a un 15% la conversión alimenticia e incrementó en un 17% a un 19% el beneficio adicional en la rentabilidad, cuando los comparamos a los grupos controles sin Astaxantina.

Tanto en Colombia como en Ecuador, Arango (1993), Arango et al.(1994), Arango et al.

(1995) y Pedraza et al. (1996) ratificaron los beneficios productivos de la Astaxantina en *P. vannamei*.

Arango (1993), reportó una mejora del 29% en el crecimiento de *P. vannamei* alimentados con 50 ppm de Astaxantina en las últimas 9 semanas de producción. En un segundo ensayo, Arango et al. (1994), evaluaron el uso de 50 ppm de Astaxantina en alimento para camarones entre la siembra (PL12) a 4.0 gr de peso vivo y entre 8.0 gr. y peso de cosecha. En condiciones semintensivas con densidades de 24.4 camarones por metro cuadrado y con un tres (3) porciento de recambio diario. Esta evaluación fue realizada en dos camaronerías, Sabana Grande e Isla Puna, con un total de once (11) piscinas, cinco (5) bajo dieta control y seis (6) recibiendo alimento con Astaxantina (50ppm). No se observó diferencia significativa entre los tratamientos para los principales índices productivos: Peso final, crecimiento semanal, conversión alimenticia, sobrevivencia y total de libras cosechadas por hectárea. La falta de significancia esta asociada a la enorme variabilidad observada entre los resultados técnicos de las dos (2) camaronerías y desafortunadamente no había un número suficiente de piscinas en una sola en ese momento. No obstante lo anterior, se observó un incremento de 10% en el peso final, una mejora de 16.6% en la sobrevivencia; un incremento de 28.6% en total libras producidas por hectárea y una disminución de 18.3% en conversión alimenticia, Tabla 1.

Tabla 1: Efecto de la Astaxantina en la producción de camarones *P. vannamei*. Proyecto Camaronera Deli-Alimentsa-Roche Ecuador

Parámetros	Control	Astaxantina 50 ppm.
No. de Piscinas	5	6
Densidad PL/Ha	243.500	244.100
Peso Final Promedio gr.	10.9+/-1.38	12.0+/-1.16
Mejora en Crecimiento. gr.		1.1 (10.0%)
Crecimiento semanal gr.	0.608	0.62
Conversión Alimenticia	2.58+/-1.7	2.18+/- 0.3
Mejora en Conversión.		-0.4 (15.6%)
Sobrevivencia.	25.8+/-7.7	30.1+/-4.5
Mejora en Sobrevivencia.		4.3 (16.6%)
No. de días.	126+/-13.3	135+/-1.2
Lb. Cosechadas / Ha.	1484.3+/-270	909.6+/-341
Incremento neto en Producción. Lbs./Ha		425.6 (28.6%)
Distribución de Tallas a la cosecha (%).		
26-30 a 51-60	40.0	69.4
61-70 a 81-100	60.0	30.6

Un punto adicional se evaluó en este ensayo, el cual había sido observado en el trabajo de Arango (1993), el efecto de la Astaxantina en la distribución de camarones en las diferentes tallas al momento de la cosecha. En general, independiente de la camaronera evaluada, se observó una mejora sustancial en la homogeneidad de los camarones al momento de la cosecha. Por mejora en

homogeneidad, los lotes de camarones que recibieron Astaxantina tuvieron un precio superior al control en 0.14 US\$/libra.

Los datos obtenidos en este ensayo, fueron sometidos a una evaluación económica, encontrándose que: por cada dólar invertido en Astaxantina se obtuvo un ingreso adicional de 4.7 dólares (US\$) sobre la rentabilidad obtenida (Tabla 2).

Tabla 2 Evaluación costo/beneficio del uso de Astaxantina en dietas para camarones. Proyecto Camaronera Deli-Alimentsa-Roche Ecuador

Parámetro	Control	Astaxantina 50 ppm.
Producción por Hectárea lbs/Ha.	1484.3	1909.6
Precio del Camarón US\$/Lb.	3.5	3.64
Ingresos Totales. US\$.	5195	6960.4
Conversión.	2.58	2.18
Consumo de Alimento Kg/ha.	1738	1890
Costo de Alimento US\$/kg.	0.42	0.42
Costo de Alimento Total. US\$.	730	794
Costo Astaxantina. US\$.		295.3
Total Costo: Alimento+ Astaxantina.		1089.3
Utilidad. US\$.	4465	5871.3
Utilidad Adicional. US\$		1406.3
Relación: Utilidad Adicional/Costo Astaxantina		4.76

Dos factores más han sido considerados dentro del proyecto de uso de Astaxantina en la nutrición de camarones. El primero, la relación entre la Astaxantina y la densidad, Pedraza et al. (1996), y el segundo, bajo condiciones semintensivas (25 pL/mt²), cual es el nivel ideal de dosificación de Astaxantina en los alimentos, Arango et al. (1995). Ambos trabajos fueron realizados con un número bajo de repeticiones, por reducida disponibilidad de espacio. Sin embargo, de acuerdo a lo obtenido en Cartagena Colombia, Pedraza et al. (1996), podemos concluir que: en la medida que incrementamos la densidad, de 125.000 PL/Ha a 710,000 PL/Ha podemos esperar una mayor respuesta al uso de la Astaxantina en dietas para camarones, *P. vannamei* (Tabla 3), y una mayor retorno adicional económico obtenido por dólar invertido en Astaxantina (Tabla 4).

Tabla 3: Efecto de la Astaxantina en la producción de camarones *P. vannamei* a dos densidades de siembra. Proyecto

Océanos-Roche Colombia-Roche Ecuador

Parámetro	Control		Astaxantina 50 ppm.	
	Océanos	Agrotijo	Océanos	Agrotijo
Camaronera				
número de piscinas	1	1	2	1
Densidad PL/Ha	125.000	710.000	125.000	710.000
Peso final promedio (gr)	13.94	9.8	15.12+/-0.73	12.9
Mejora en Crecimiento. gr			1.18 (8.4%)	3.1 (31.6%)
Conversión Alimenticia.	1.51	1.4	1.39+/-0.03	1.2
Mejora en Conversión		0.12 (12.0 %)	0.2 (14.3 %)	
Sobrevivencia.	58.7	37.0	57.9+/-2.7	37.8
Mejora en Supervivencia.				0.8 (2.2%)
No. de días.	99	138	99	138
Lb. Cosechadas/ Ha.	2262	5885	2410+/-3.3	7575
Incremento neto en producción. Lbs./Ha		148 (6.6%)	1690 (28.7%)	

Tabla 4. Evaluación costo/beneficio del uso de Astaxantina en dietas para camarones. Proyecto Océanos-Roche Colombia-Roche Ecuador Camaronera Agrotijo

Parámetro	Control	Astaxantina 50 ppm
Producción por Hectárea lbs/Ha.	5885	7575
Precio del Camarón. US\$/Lb.	1.82	2.04
Ingresos Totales. US\$.	9693	14472
Conversión.	1.40	1.20
Consumo de Alimento. Kg/ha.	3773	4242
Costo de Alimento. US\$/kg.0.62	0.62	
Costo de Alimento Total. US\$./ha	2339	2630
Costo Astaxantina. US\$.		662.5
Total Costo: Alimento + Astaxantina. US\$/ha.		3293
Utilidad. US\$.	3579	7896
Utilidad Adicional. US\$.		4317
Relación: Utilidad Adicional US\$/Costo Astaxantina US\$.		6.5/1.0

En cuanto a dosis de Astaxantina y respuesta productiva, Arango et al. (1995), los mejores resultados técnicos y la mayor rentabilidad fueron obtenidos con 50 ppm de Astaxantina. Estos dos trabajos serán repetidos en el transcurso del próximo año en el Centro Regional de Investigación en Acuicultura Roche-Cachugran, en Chongon. Con una mayor número de repeticiones, para tener una mayor confiabilidad estadística.

La información acumulada en los últimos cinco años y nuestra experiencia práctica, nos permite afirmar que el uso de la Astaxantina en alimentos para camarones no debe ser considerada

bajo un simple concepto de presentación, pigmentación, sino como nutriente. El cual es necesario para el mantenimiento, crecimiento y reproducción de los camarones bajo condiciones comerciales.

BIBLIOGRAFIA

- Arango G., Jose Ignacio. 1993. Evaluación comercial del uso de Astaxantina en alimento para camarones (*Penaeus Vannamei*). Primer Seminario Internacional Roche de Acuicultura. Proyecto Carophyll Pink en Camarones. Propellets-Promarisco-Aquanova-Ecuaroche. San Antonio, Provincia de Guayas. 18 de Octubre de 1996, Restaurante el Cantones, Guayaquil, Ecuador. Por publicar.
- Arango G., Jose Ignacio., Mora O y Zuñiga A. 1994. Evaluación del uso de Astaxantina (Carophyll Pink 8%) en la alimentación de camarones, *Penaeus vannamei*. Primer Seminario Internacional Roche de Acuicultura. Proyecto Carophyll Pink en Camarones. Alimetsa-Camaronera Deli-Roche Ecuador. 18 de Octubre de 1996. Restaurante el Cantones,Guayaquil. Ecuador. Por publicar.
- Arango G. Jose Ignacio., Mora O, y Zuñiga A. 1995. Evaluacion de niveles crecientes de Astaxantina (0, 50,100, 150 ppm) en dietas para camarones, *Penaeus vannamei*. Primer Seminario Internacional Roche de Acuicultura. Proyecto Carophyll Pink en Camarones. Alimentos-Camaronera Deli-Roche Ecuador. Isla Puna. Ecuador. 18 de Octubre de 1996. Restaurante el Cantones. Guayaquil, Ecuador. Por publicar.
- Bendich, A. 1989. Carotenoids and the immune response. *J. Nutrition*. 119: 112-115.
- Chien Y.H. and Jeng S.C. 1992. Pigmentation of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture* 102:333-346.
- Estermann.R., 1994. Micro-ingredients-abstracts. Biological fuctions of carotenoids *Aquaculture*. 124(4):219
- Goodwin T.W. 1986. Metabolism, Nutrition and Function of carotenoides. *Ann. Rev. Nutr.* p. 273-297.
- High Mark., 1995. El efecto de la astaxantina en la maduración del camarón, *Penaeus vannamei*. Tercer Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Octubre 27 a Noviembre 1 de 1995. Poster.
- Kurashige M., Okimasu E., Inoue M and Utsumi K. 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys.& Med. NMR*. 22:27-38.
- Kurmaly K. 1993. Increase in harvest yield and net benefit using Carophyll Pink (Astaxanthin),in shrimp feed. *Aquaculture News* 2(1):1

- Kurmaly K. 1993. Health and nutrition complete with astaxanthin. Part I. Physiological functions. *Aquaculture News*. Vol.1(1):3.
- Kurmaly K. 1994. Commercial trial results with Carophyll Pink (Astaxanthin) fed to *Penaeus monodon* in Chantaburi, Thailand. *Aquaculture News*. 3(1):1
- Kurmaly K. 1994. Mode of operation of Carophyll Pink (Astaxanthin). *Aquaculture News*. Vol.3(1):1.
- Kurmaly K. 1995. Astaxanthin and its role in animal performance. Protection of cell and organelle membranes. *Aquaculture News*. 4(1):1
- Kurmaly K. 1995. Astaxanthin: Principal aspects in use of Astaxanthin in Shrimp Nutrition. In: *Vitamina C y Astaxantina en la Nutrición de Camarones*. 23 de Marzo de 1995, Salon Los Candelabros, Hotel Continental. Guayaquil, Ecuador.
- Kurmaly, K., and Guo, F.C. 1995. Effect of environmental stressors; High ammonia, low dissolved oxygen, low salinity, high salinity and low temperature shock on vitamin C and astaxanthin content of shrimp tissues. Roche Aquaculture Centre Far East (RACFE). Rovithai Ltd.
- Kurmaly K and Latscha T. 1993. Health and nutrition complete with astaxanthin Part I. Physiological functions. *Aquaculture News* 1(1):3
- Latscha T. 1989. The role of Astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture*. Aquacop. IFREMER. Actes de Colloque. 9:319-325.
- Latscha T. 1991. Crustacean pigments. *Crustacean Nutrition Newsletter*. 7(1):53-60.
- Latscha T. 1991A. Carotenoids in aquatic animal nutrition. *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*. D.M. Akiyama and R.K.H. Tan Eds. American Soybean Association. p. 68-79.
- Menasveta P. 1993. Biological benefits of carotenoids: Astaxanthin. *Feed Production Tomorrow*. II: Animal Nutrition Vietnam International. 26th October 1993. Bangkok Thailand. 18 p.
- Menasveta P., W. Worawattanamateekul., T Latscha and J.S. Clark. 1993. Correction of Black Tiger Prawn (*Penaeus monodon*, Fabricius) coloration by Astaxanthin. *Aquaculture Engineering*. 12(4): 203-213.
- Meyers S.P. 1994. Developments in world aquaculture, feed formulations and role of carotenoids. *Pure. Appl. Chem*. 66(5): 1069-1076.
- Miki W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure. Appl. Chem* 63(1):141-146.

- Negre-Sadargues G., Castillo R., Petit H., Sance S., Martinez R.G. Milicua J.C. Choubert G and Trilles Jean-Paul. 1993. Utilization of synthetic carotenoids by the prawn, *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. *Aquaculture*. 11:151-159.
- Pedraza., L.,J. C., Rey H. y Arango G. Jose I. 1996. Efecto de la Astaxantina en la producción de camarones, *Penaeus vannamei*, a dos densidades de siembra.In. Proyecto Carophyll Pink en Camarones. Océanos-Productos Roche Colombia-Roche Ecuador. Cartagena, Colombia.
- Prabhala, R.H., Maxey, H. M and Watson, R., 1989. Enhancement of the expression of activation markers on human peripheral blood mononuclear cells by in vitro culture with retinoids and carotenoids. *J.Leucocyte Biology*, 45: 249-254.
- Yamada S., Y.Tanaka., M. Sameshima and Y. Ito. 1990. Pigmentation of prawns (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I.Effect of dietary astaxanthin, beta-carotene and canthaxanthin pigmentation. *Aquaculture*. 87:323-330.

POSIBILIDADES DE INMUNOESTIMULACION DEL CAMARON A TRAVES DEL ALIMENTO

*Francisco Vargas-Albores, Inocencio Higuera-Ciapara, Flor Jiménez-Vega,
Jorge Hernández-López, Teresa Gollas-Galván y Gloria Yepiz-Plascencia.*

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. DTAOA. Biotecnología
Marina. Hermosillo, Son. CIAD, A.P. 1735, Hermosillo, Son, C.P. 83000
Tel + Fax: (62) 80-00-58
email: fvargas@cascabel.ciad.mx**

INTRODUCCION

La nutrición y el control de enfermedades son los puntos que han requerido mayor atención por parte, no solamente de los acuacultores, sino de todos los involucrados en la producción animal. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el manejo de los organismos no acuáticos, las enfermedades de los organismos acuáticos encuentran en el medio, una vía importante de diseminación, la cual dificulta su control. Mientras que los aspectos relacionados con la nutrición animal repercuten directamente en los gastos de operación, el control de las enfermedades es el punto de mayor riesgo durante el desarrollo del cultivo. Los impactos de las enfermedades sobre la producción han sido cuantiosos, básicamente por la frecuencia con que las enfermedades están apareciendo, su fácil diseminación y la ausencia de tratamientos efectivos.

La aparición de la enfermedad está relacionada al rompimiento del equilibrio entre: el medio ambiente, la fisiología del hospedero y las estrategias invasoras del parásito. El control de las condiciones del medio ambiente se dificulta por los volúmenes de agua requeridos para los cultivos comerciales. Los tratamientos contra los agentes causales, además de ser costosos y producir daños al medio ambiente, hasta ahora no han sido eficientes. Más aún, en el caso de enfermedades virales, incluyendo las que afectan al hombre, solamente se conocen tratamientos sintomáticos, ya que aún no se comercializan compuestos antivirales, por su baja eficiencia, reacciones secundarias y alto costo.

El tercer componente, relacionado con la fisiología del animal, parece ser el camino más factible para controlar las enfermedades y, de ese modo, disminuir el riesgo en la inversión. El conocimiento de la bioquímica fisiológica de los animales es un paso obligado para el planteamiento de tales estrategias. La nutrición es el tratamiento primario para el control de las enfermedades, ya que un organismo con deficiencias nutricionales, es más susceptible a las enfermedades, por la ausencia de factores necesarios para el sistema de defensa.

Por otro lado, la inmunestimulación profiláctica ha sido una de las técnicas más exitosas, empleadas para el control de enfermedades infecciosas en el hombre. Por ello se ha propuesto el uso de ésta herramienta para organismos cultivables. Sin embargo, para lograr su diseño y utilización es necesario conocer los mecanismos de defensa involucrados, los requisitos para su estimulación, su regulación y su expresión. Desafortunadamente, en los invertebrados, poco se conoce sobre el sistema de defensa.

EL SISTEMA INMUNE

Debido al pobre conocimiento que se tiene sobre el sistema inmune de los invertebrados, su existencia es discutida, principalmente, por la falta de evidencias sobre la especificidad de la respuesta y de memoria inmunológica. Estos dos elementos son necesarios para establecer una estimulación del sistema inmune y poder utilizar el control profiláctico. El sistema inmune de los invertebrados, hasta ahora, ha mostrado diferencias con el sistema inmune de los vertebrados, principalmente por la ausencia de moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides. Sin embargo, se espera que el sistema de defensa en los invertebrados tenga la misma función que en los vertebrados.

La función del sistema inmune es mantener la individualidad biológica. Por ello, su principal actividad es diferenciar y eliminar todo material extraño de sus tejidos. Para lograrlo, el sistema inmune de los invertebrados deberá contener los elementos básicos necesarios: moléculas de reconocimiento, moléculas y células efectoras, sistemas amplificadores y reguladores. Estos elementos podrán estar englobados en factores humorales, factores celulares y sistemas multiméricos que involucre a ambos tipos de factores.

EL SISTEMA INMUNE DEL CAMARON

El primer paso para intentar la inmunestimulación en los camarones es demostrar la existencia de moléculas específicas de reconocimiento y, que tales moléculas, pueden ser inducidas o activadas. Además, y tal vez sea la parte más difícil, es encontrar una forma operativamente viable de llevar a cabo la inmunestimulación. En los camarones se han descrito algunos componentes posiblemente involucrados en los sistemas de defensa incluyendo: células circulantes o hemocitos, proteínas plasmáticas, enzimas e inhibidores [1-3, 5, 6, 8, 12].

HEMOCITOS

Al igual que en otros crustáceos, en el camarón se han detectado, al menos, tres tipos de células circulantes: los hemocitos hialinos, los hemocitos de gránulos pequeños y los hemocitos de gránulos grandes. Los hemocitos hialinos son células que se adhieren y extienden fácilmente, no contienen gránulos densos, y se encuentran involucrados en el proceso de coagulación. Los hemocitos que contienen gránulos pequeños, son los más abundantes y muestran semejanza a los leucocitos polimorfonucleares de los vertebrados. Los hemocitos con gránulos grandes constituyen el 20-30% de las células circulantes. Los gránulos de ambos tipos de células contienen enzimas involucradas en la destrucción de patógenos, incluyendo el sistema profenoloxidasas. Estos son, de acuerdo a nuestras observaciones las células más activas desde el punto de vista inmunológico. Ellas participan en la fagocitosis, la adhesión y el encapsulamiento,

además de contener las enzimas necesarias para la melanización y otras enzimas de defensa [5 y 7].

SISTEMAS MULTIMÉRICOS

En asociación con las células circulantes se encuentran: el sistema de la coagulación y el sistema profenoloxidase (proPO). El primero es el responsable de establecer una barrera física para evitar la invasión y la pérdida de hemolinfa, ya que los camarones tienen un sistema circulatorio abierto. Por su parte, el sistema proPO se encargará de eliminar los patógenos que hayan podido penetrar al interior del organismo.

COAGULACION

El sistema de coagulación de los camarones tiene semejanzas con el sistema de coagulación de los vertebrados. La proteína análoga al fibrinógeno de los vertebrados, responsable de la formación del coágulo en los camarones es llamada clotting protein (CP). Esta proteína está formada por dos subunidades de 200 kDa, que se encuentran unidas por puentes disulfuros. La CP del camarón ha sido purificada y su secuencia N-terminal muestra homología con la proteína de la langosta y del langostino, lo que sugiere un origen común. Mas aún, el fibrinógeno de los vertebrados aparentemente tiene el mismo origen.

A diferencia de la CP, el fibrinógeno necesita ser convertido a fibrina para que una TGasa sérica lo polimerice. Sin embargo, en el camarón la CP es sustrato para la TGasa, la cual se encuentra en el interior de los hemocitos hialinos. La activación de los hemocitos y la liberación de la TGasa se puede llevar a cabo por estimulación directa de los hemocitos por lipopolisacáridos (LPS) o por factores celulares provenientes de la activación de las células granulares.

La reacción entre la CP y la TGasa hemocítica parece ser bastante conservada, ya que la reacción de coagulación de la CP del camarón blanco, puede realizarse con TGasa de cobayo o con lisado de hemocitos de otras especies de camarón [4, 9 y 13].

PROFENOLOXIDASA

El sistema profenoloxidasa (proPO) parece ser un complejo integrador de varios factores, ya que involucra moléculas de reconocimiento, células y sus actividades efectoras, potencializa el estímulo y requiere de reguladores para evitar el daño sobre el tejido del camarón. El sistema proPO del camarón se encuentra en el interior de los gránulos de los hemocitos granulares y puede ser liberado por estimulación de las células con beta-glucano o LPS. Una vez liberado el contenido granular, la proPO es transformada, por acción de una proteinasa, en fenoloxidasa. Esta última es la responsable de la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales se convierten en melanina.

La proteinasa responsable de transformar la proPO, llamada enzima activadora de la proPO (EAPP), es del tipo serina y se encuentra en forma inactiva en el interior del gránulo. Sin embargo, cuando el gránulo es liberado a la hemolinfa, la EAPP se activa en presencia del calcio

plasmático (8-10 mM). Además de activar la proPO, la EAPP puede dañar otros componentes y/o tejidos del camarón, por lo que su acción debe ser limitada por inhibidores de proteinasas (antitripsina y alfa-2-macroglobulina).

Aunque la activación del sistema proPO puede hacerse en forma directa por componentes microbianos, en el camarón se han detectado proteínas plasmáticas que reconocen a BG y LPS. Los cuales son considerados como componentes humorales [1, 3, 5, 9, 10 y 13].

FACTORES HUMORALES

Además de las proteínas de reconocimiento, también se han descrito proteínas con actividad lítica y se han detectado inhibidores de proteinasas. Las moléculas de reconocimiento posiblemente sean las más importantes, ya que después de reaccionar con el “antígeno” activan funciones celulares.

LPS-BP

Esta proteína fue descrita como una aglutinina que reconoce LPS y es capaz de aglutinar bacterias. Sin embargo, una vez que reacciona con el LPS o bacterias, es capaz de unirse a los hemocitos y estimular la fagocitosis. Aunque los hemocitos pueden llegar a lisarse cuando la fagocitosis es extensa, y esto provoque la activación de los sistemas proPO y de coagulación, no tenemos evidencias de una activación directa de la LPS-BP sobre el sistema proPO [5, 8, 13].

BGBP

BGBP posiblemente representa el mejor caso de una molécula de reconocimiento que activa sistemas celulares, ya que tiene un efecto directo sobre el sistema proPO. Esta proteína reconoce y se une a beta glucanos. El complejo glucano-BGBP se une a los hemocitos granulares y produce la liberación de los gránulos. Una vez liberados los gránulos, el sistema es activado por la presencia de calcio plasmático.

BGBP es una glicoproteína de 100 kDa que parece ser altamente conservada. Su peso molecular y contenido de aminoácidos es muy similar en el camarón café, blanco y azul, así como en el langostino y otras especies de agua dulce estudiadas. Además, la secuencia N-terminal de la BGBP del camarón café y del camarón blanco muestra gran homología entre ellas y con la BGBP del langostino [5, 11-13].

Debido a que ésta proteína puede reaccionar con glucanos libres que se encuentran en la hemolinfa y activar la maquinaria celular [9], es necesario considerar las consecuencias de una inoculación de beta glucanos en los camarones.

SOBRE LA INMUNIZACION

La estimulación del sistema inmune de los animales, puede ser muy simple desde el punto de vista teórico. Sin embargo, es necesario demostrar la presencia de células o moléculas de

reconocimiento y memoria inmunológica. Mientras que factores de reconocimiento se han descrito en el camarón, hasta la fecha no ha sido posible la demostración de una memoria inmunológica. Probablemente esto se debe a la falta de herramientas para medirla.

El uso de microorganismos atenuados, ha sido una de las técnicas más utilizadas para la inmunización. Sin embargo, recientemente el uso de componentes microbianos, compuestos sintéticos y vacunas basadas en tecnología de ácidos nucleicos se están difundiendo. Para lograr la inmunización es necesario un contacto adecuado entre el antígeno y el sistema inmune, lo cual no es suficiente con inocularlo. Se requiere determinar la vía y la dosis apropiada, dependiendo de las características del inmunógeno, su absorción, digestibilidad, etc. En los vertebrados, la hipersensibilidad, la tolerancia o la alergia son cuadros que se desarrollan fácilmente, sobre todo en experimentación, por una inmunización inadecuada.

Además, el antígeno deberá poseer algunas propiedades fisicoquímicas que le permitan ser compatibles con los sistemas biológicos, especialmente el sistema inmune. Por ejemplo, digestibilidad.

Para que un antígeno de alto peso molecular pueda ser procesado, se requiere que sea degradado. Del mismo modo, un antígeno muy pequeño no puede ser antigénico porque la señal del epítopo requiere un tamaño mínimo. Soderhall determinó que el tamaño mínimo para activar el sistema proPO es de 6 unidades de hexosa, lo cual es compatible con lo observado en los vertebrados, donde el tamaño mínimo es el equivalente a 5 aminoácidos o 6 hexosas. Sin embargo, es necesario recordar que los glucanos poseen enlaces beta y que las enzimas para su degradación son más bien de origen microbiano.

La estimulación por glucanos ha sido probada por varios autores y los resultados son controversiales, principalmente por la falta de un indicador apropiado de la respuesta inmune del camarón. Pero, además, podría estar influenciado por la falta de estandarización en la metodología de inmunización. Independientemente de los aspectos de manipulación, se requiere un inóculo inmunológicamente adecuado, tanto en composición, tamaño y carga, como en la dosis, número y periodicidad de las inmunizaciones.

La vía de inmunización también es importante, sobre todo en el caso de organismos pequeños, donde la eficiencia de inmunización se debe valorar en términos de factibilidad técnica. Hasta ahora no hay evidencias de que el inóculo entre en contacto con el sistema inmune de los camarones, cuando la inmunización se lleva a cabo por el agua o por el alimento. Aunque en algunos experimentos se han visto incrementos en la sobrevivencia atribuibles a un contacto previo con bacterias o sustancias microbianas, no se han aportado evidencias de una estimulación del sistema inmune en términos de incremento o decremento de algún componente involucrado.

La factibilidad técnica de la inmunización en los camarones por contacto o suministro de "antígeno" disminuyen al considerar el número de organismos y los diferentes medios donde son cultivados. La inoculación directa es una vía que debe ser olvidada debido al número y el tamaño de los organismos.

Independientemente de las dificultades técnicas para la inmunización de los camarones, debe señalarse que los camarones deben ser inmunizados en edades tempranas, donde son más susceptibles a infecciones. Sin embargo, el sistema celular de los camarones, responsable de la defensa en contra de virus y parásitos, es el que más tarda en madurar.

Esto que aparentemente dificulta el éxito de la inmunoestimulación, permite proponer otras formas para lograrlo. Es decir, además de la estimulación directa con el “antígeno”, la inmunoestimulación podría llevarse a cabo por sustancias que potencializarán el sistema celular de los camarones. Es más, probablemente el efecto protector que han observado algunos investigadores, al utilizar beta glucanos, se deba a un incremento en la capacidad inmunológica, más que a una inmunización.

PERSPECTIVAS

Pese a los problemas existentes, la inmunoestimulación podría ser el camino profiláctico para resolver los problemas de enfermedades infecciosas en los camarones. Sin embargo, a la luz de los nuevos avances en la biología molecular, se pueda llegar al diseño de vacunas basadas en esta tecnología. Por otro lado, la búsqueda de especies o variedades más resistentes, ya sea naturales o manipuladas, pueda ser una alternativa. En todos los casos, el conocimiento sobre el sistema inmune de los camarones, sus componentes y su regulación, será un conocimiento fundamental.

REFERENCIAS

1. Gollas-Galván, T.; Hernández-López, J. and Vargas-Albores, F. 1997 Effect of calcium on the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) prophenol-oxidase system activation. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A:419-425;
2. Guzmán-Murillo, A.; Ochoa, J. L. and Vargas-Albores, F. 1993 The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:271-275;
3. Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 113C:61-66;1996
4. Montaña-Pérez, K.; Yepiz-Plascencia, G.; Higuera-Ciapara, I. and Vargas-Albores, F. Purification and characterization of the clotting protein from the white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comparative Biochemistry & Physiology*. In press
5. Vargas-Albores, F. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *J. Mar. Biotechnol.* 3:153-156;1995
6. Vargas-Albores, F. Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia* 46:33-45;1995

7. Vargas-Albores, F.; Gollas-Galván, T. and Hernández-López, J. Separation of hemocytes populations from *Penaeus californiensis*, *P. vannamei* and *P. stylirostris* by density gradient. *Crustacean Biology* Submitted
8. Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, A. and Ochoa, J. L. A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A:407-413;1993
9. Vargas-Albores, F.; Hernández-López, J.; Gollas-Galván, T.; Montaña-Pérez, K.; Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products, in *Advances in shrimp biotechnology*, T. W. Flegel, Editor. 1998: Bangkok. p. 26-30.
10. Vargas-Albores, F.; Hinojosa-Baltazar, P.; Portillo-Clark, G. and Magallón-Barajas, F. Influence of temperature and salinity on the proPO system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Aquaculture Research* In press
11. Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Söderhäll, K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Develop. Comp. Immunol.* 20:299-306;1996
12. Vargas-Albores, F.; Jiménez-Vega, F. and Yepiz-Plascencia, G. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.* 116B:453-458;1997
13. Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. Shrimp Immunity. *Res. Trends* In press

LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS PLASMATICAS DE CAMARON

*Gloria Yepiz-Plascencia, Ruiz-Verdugo, L.M., García-Bañuelos,
M.L., Romo-Figueroa, M.G., Jiménez-Vega, F. Vallejo-Cohen,
S. y Vargas-Albores, F.*

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
Hermosillo, Sonora, A.P. 1735 Hermosillo, Sonora,
83,000 México**

Tel: +52 (62) 80 0057

Fax: +52 (62) 80 0058

e-mail: gyepiz^o@cascabel.ciad.mx

RESUMEN

Los lípidos son moléculas muy importantes para todos los organismos vivos, incluyendo a los crustáceos; ya que son de alto valor energético y proveen componentes indispensables para la formación de membranas. En crustáceos, el colesterol y los ácidos grasos poliinsaturados son además esenciales para un adecuado crecimiento y desarrollo, y por lo tanto deben de ser aportados por la dieta. El transporte de los lípidos en la sangre o hemolinfa es mediado por lipoproteínas. En crustáceos se han identificado lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de muy alta densidad (VHDL). La lipoproteína de alta densidad del camarón blanco tiene una densidad de 1.14 gr/ml y ha sido caracterizada como una molécula compuesta de una apolipoproteína glicosilada de 98 kDa, donde los carbohidratos asociados contienen manosa y los lípidos corresponden a aproximadamente 50% de la molécula. Los lípidos mas abundantes en el plasma de camarón blanco y en la lipoproteína son los fosfolípidos, seguido de los acilglicérols, esterols y trazas de ácidos grasos libres, siendo esto similar a los reportes de la HDL del langostino *Pacifastacus leniusculus*. Se determinó la composición de aminoácidos y el terminal amino de la apolipoproteína, encontrándose una alta homología con la HDL de *P. leniusculus*. Se demostró que la HDL se sintetiza y localiza en el hepatopáncreas por inmunocitoquímica y PCR. Utilizando anticuerpos policlonales contra la lipoproteína del camarón blanco, se ha detectado la presencia de proteínas homólogas en la hemolinfa del camarón café (*P. californiensis*) y del camarón azul (*P. stylirostris*). Recientemente se identificó también, una lipoproteína glicosilada de muy alta densidad compuesta por dos subunidades de aproximadamente 200 kDa unidas por puentes disulfuros.

INTRODUCCION

El camarón es uno de los recursos pesqueros más importantes en el Noroeste de México. Su comercialización proviene de la captura de camarón silvestre y de la acuicultura. Esta última toma cada día mas importancia: de las 15, 223 toneladas de camarón obtenidas en el ciclo de 1995, aproximadamente 2,500 correspondieron a camarón de cultivo (SEMARNAP-Imparcial, 1996).

Los métodos de cultivo utilizados van desde un sistema extensivo tradicional hasta uno intensivo, donde la concentración de animales provoca situaciones que ocasionan pérdidas por agresión, canibalismo y, al mismo tiempo, aumentan la susceptibilidad a las enfermedades (Briggs et al., 1988).

Por otro lado, hay que considerar que para tener competitividad es necesario mantener un adecuado control de costos, especialmente del alimento, el cual puede representar hasta el 60% de los costos de producción (Infofish, 1988).

Hasta ahora, la proteína es el componente mas vigilado y costoso de las dietas, sin embargo, el cuidado de la cantidad y calidad de los lípidos está tomando cada vez mas importancia. Por ello, para aumentar la eficiencia en la conversión de alimento a tejido, es necesario profundizar en el conocimiento de los lípidos. Esto permitirá a mediano y largo plazo, optimizar las condiciones de cultivo. Para lograrlo, es necesario estudiar y relacionar los aspectos nutricionales, bioquímicos y fisiológicos de los lípidos y de su transporte desde los sitios de absorción y almacenamiento hasta los sitios donde son utilizados.

En este trabajo, nuestro grupo se ha enfocado al estudio de los lípidos plasmáticos y sus acarreadores que son las lipoproteínas, primeramente identificando las moléculas y después determinando sus características moleculares así como su lugar de síntesis.

LIPIDOS PLASMATICOS

A pesar de que los lípidos son importantes en la alimentación de los crustáceos, incluyendo el camarón, los estudios bioquímicos y la caracterización de estos componentes plasmáticos son escasos.

Los niveles de lípidos plasmáticos en crustáceos son relativamente bajos, sin embargo ocupan el segundo lugar en concentración entre los componentes del plasma, siendo superados solo por la proteínas (Dall et al., 1990). Se ha determinado que en los camarones, al igual que en otros crustáceos, el ácido linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentanoico, docosahexenoico y el colesterol son importantes tanto para el metabolismo energético, como para la formación de membranas celulares y de hormonas durante los procesos de crecimiento, desarrollo, maduración y reproducción (Dall et al., 1993). Sin embargo, mucho falta por conocer sobre su regulación, almacenamiento y transporte.

El principal órgano de reserva de los lípidos es el hepatopáncreas o glándula digestiva de

donde son liberados hacia el plasma (Dall et al., 1990). Aunque los lípidos parecen estar involucrados en la reproducción y ser requeridos para la formación de los huevos, la concentración de proteínas y de lípidos en el plasma del camarón blanco *P. vannamei* juvenil fue muy similar en ambos sexos. Como se aprecia en la Tabla 1, las concentraciones plasmáticas de las proteínas fueron de aproximadamente 100 mg/ml, mientras que la de lípidos fue de aproximadamente 2.4 mg/ml tanto para hembras como para machos (Ruiz Verdugo, 1996). Estos valores son similares a lo reportado respecto a lípidos plasmáticos en *P. japonicus* con 2.5 mg/ml (Lee, 1991) y un rango de 3 a 8 mg/ml (Vazquez-Boucard et al., 1989).

Tabla 1. Concentración de proteína y lípidos en *P. vannamei*

Muestra		Proteína(P) (mg/ml)	Lípidos L) (mg/ml)	L + P (mg/ml)	%L
Plasma	H	96.06 + 1.21 ^a	2.37 + 0.11	98.42	2.4
	M	102.05 + 0.90 ^a	2.55 + 0.11	104.60	2.44
HDL	H	1.85 ^b	1.42 + 0.13	3.28 ^b	43.41 ^b
	M	1.93 ^b	0.94 + 0.06	2.87 ^b	32.87 ^b

^a Media y desviación estándar de tres repeticiones.

^b Datos basados en HDL corregida por ELISA.

Los lípidos plasmáticos del camarón blanco fueron identificados por cromatografía de capa fina (CCF), observándose que los fosfolípidos son los compuestos mas abundantes. Cabe señalar, que el alto contenido de fosfolípidos, es una característica de los crustáceos (Chang y O'Connor, 1983) aunque en el plasma de camarón también se detectaron esteroles y diacilgliceroles (Ruiz Verdugo et al., submitted). El análisis de los fosfolípidos por CCF en dos dimensiones identificó en orden de abundancia, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina y bajas concentraciones de esfingomielinea y lisofosfatidilcolina, Figura 1 (Ruiz Verdugo et al., submitted). Estos mismos compuestos se han encontrado en la hemolinfa de diversos crustáceos (Lee, 1991; Lee y Puppione, 1988; Mourente et al., 1994; Spaziani et al., 1986; Spaziani y Wang, 1991; Stratakis et al., 1992).

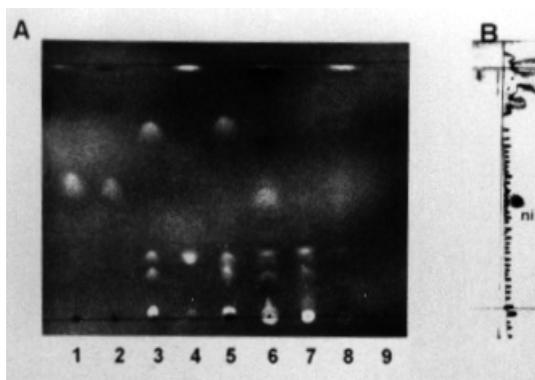


Figura 1. CCF. Análisis de lípidos plasmáticos por TLC. Panel A, lípidos neutros, carril 1, ácido linoleico; carril 2, ácido palmítico; carril 3, acil palmitinas; carril 4, esteroides; carril 5, estearinas; carril 6, plasma de camarones machos; carril 7, plasma de camarones hembras; carril 8, plasma humano; carril 9, BHT. Panel B, separación de fosfolípidos en 2D-CCF; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; LPC, lisofosfatidilcolina; SP, esfingomiélinea.

LIPOPROTEINAS PLASMATICAS

Debido a su baja solubilidad en agua, los lípidos requieren una vía de transporte a través del sistema circulatorio de los animales (Haunerland, 1989). Estos acarreadores son proteicos y el complejo lípido-proteína constituyen las lipoproteínas (Lp) (Lee, 1991), las cuales son las responsables de la movilización de lípidos desde los sitios de absorción o almacenamiento, hacia los sitios de utilización. El conocimiento sobre las lipoproteínas de crustáceos es reciente y escaso, siendo superado por los estudios en insectos (Kanost et al., 1990). Actualmente se han descrito dos tipos de lipoproteína en el plasma de los crustáceos. Las lipoproteínas de transporte presentes tanto en machos como en hembras y las vitelogeninas. Estas últimas son lipoproteínas asociadas con la reproducción, específicas de las hembras en estado reproductivo, y son las encargadas del transporte de lípidos hacia los oocitos (Lee, 1991).

LIPOPROTEINAS DE TRANSPORTE

El estudio de las lipoproteínas de transporte es importante desde diversos puntos de vista, incluyendo: la evolución de los medios de transporte de lípidos en animales, su función como proveedores de lípidos para los órganos de utilización, su papel en la movilización de lípidos de reserva, el control hormonal del metabolismo de lípidos y el transporte de lípidos para la formación de membranas (Spaziani y Wang, 1991).

Debido a la presencia de lípidos, la densidad de las lipoproteínas es menor que la de la mayoría de las proteínas. A su vez, la cantidad de los lípidos puede variar y con ello su densidad. Las lipoproteínas se clasifican en base a su densidad en: muy baja densidad (VLDL \ll 1.006 g/ml), baja densidad (LDL 1.006-1.06 g/ml), alta densidad (HDL 1.06-1.21 g/ml) y lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL \gg 1.21 g/ml) (Lee y Puppione, 1978; Lee, 1991; Mathews y van Holde, 1990). La diferencia de densidad también se ha utilizado para el aislamiento de lipoproteínas por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad (Eldestein y Scanu, 1986).

Una Lp de transporte de alta densidad (HDL), no asociada con el sexo se aisló de plasma de *P. vannamei* mediante dos pasos consecutivos de ultracentrifugación en gradiente de densidad de bromuro de potasio. La HDL tiene una densidad en el rango de 1.10 a 1.17 g/ml con un pico máximo a 1.14 g/ml. La presencia de lípidos se corroboró porque la HDL se une al colorante lipofílico negro de Sudán en electroforesis nativas, (Yepiz-Plascencia et al., 1995). Esta HDL está presente en concentraciones similares en camarones juveniles de ambos sexos, por lo que se considera como una lipoproteína no asociada con el sexo (Yepiz-Plascencia et al., 1995). Estas HDLs también se han estudiado y reportado en *P. japonicus* (Teshima y Kanazawa, 1980), y *P. semisulcatus* (Tom et al., 1993).

Aunque con la misma función, la HDL del camarón tiene diferencias con la HDL de otros organismos. Mientras que las lipoproteínas de mamíferos (Roheim, 1986) o insectos tienen dos o más apoproteínas (Kanost et al., 1990), la HDL de *P. vannamei* contiene solo una apoproteína de alto peso molecular, 98 kDa (Figura 2). La proteína además de lípidos asociados, posee residuos de carbohidratos tipo manosa covalentemente ligados al polipéptido, los cuales se

identificaron por medio de reacciones con lectinas (Yepiz-Plascencia et al., 1995).

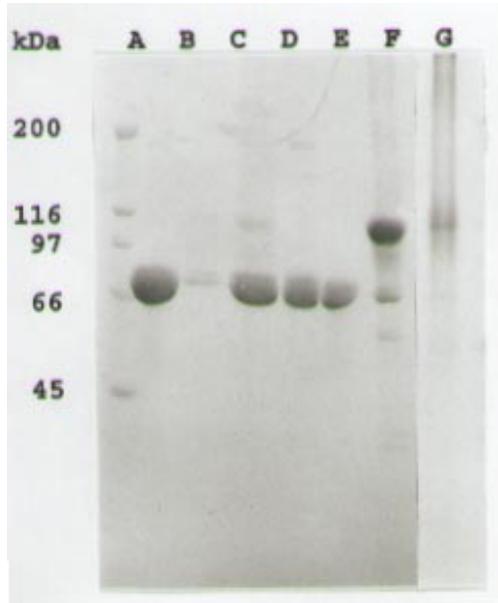


Figura 2. SDS-PAGE. Análisis electroforético de fracciones obtenidas en el aislamiento de la HDL por ultracentrifugación en gradiente de densidad. Estándares de pesos moleculares; A,B,C,D y E , fracciones I, II, III y IV del primer gradiente de ultracentrifugación. A, plasma; B, fracción I; C, fracción II; D, fracción III; E, fracción IV; F y G, HDL aislada por dos gradientes consecutivos de ultracentrifugación.

A la HDL purificada se le determinó su secuencia N-terminal y su composición de aminoácidos (Ruiz Verdugo et al., submitted). Aunque los 15 residuos determinados re-presentan solamente el 2% de la apoproteína, se encontró alta similaridad con el N-terminal de la HDL del langostino *Pacifastacus leniusculus*, (Hall et al., 1995) y el alineamiento de estas dos secuencias se presenta en la Figura 3 (Ruiz Verdugo et al., submitted).

La identidad entre estas dos secuencias es de 67%, subiendo hasta 87% si se toman en cuenta los residuos de aminoácidos reemplazados por un cambio conservativo. Esta similitud es muy alta, considerando el tamaño del fragmento secuenciado y que provienen de un crustáceo marino (camarón) y de uno de agua dulce (langostino), por lo que es posible que esta proteína esté ampliamente distribuida en los crustáceos y que sea altamente conservada.

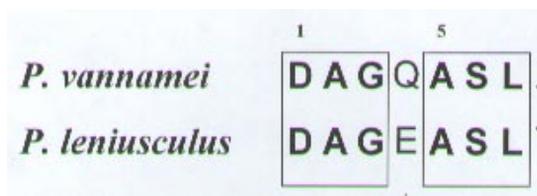


Figura 3. Alineación de las secuencias N-terminal de las HDL de *P. vannamei* y *Pacifastacus leniusculus*. Los residuos encerrados en el cuadro son idénticos en ambas secuencias. Se indican con + los residuos que corresponden a reemplazamientos conservados.

Por su parte, el contenido de aminoácidos de la HDL de camarón refleja un alto contenido de ácido aspártico+asparagina y de ácido glutámico+glutamina, un bajo contenido de metionina y un contenido moderado de aminoácidos aromáticos y básicos (Ruiz-Verdugo et al., submitted), similar a los componentes de la HDL plasmática no asociada con el sexo de *Potamon potamios* (Stratakis et al., 1992).

Los lípidos constituyentes de la HDL purificada y del plasma también han sido estudiados. Para esto se utilizaron microtécnicas enzimáticas acopladas, de forma independiente de HDL de hembras y machos para la cuantificación. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cuantificación de clases de lípidos en plasma y HDL de camarón (mg/ml)*

Muestra		AGL ¹	ACG ²	Esteroles ²	Fosfolípidos
Plasma	H	3.87 + 0.39	36.84 + 4.89	25.32 + 1.53	1.43 + 0.32
	F	1.26 + 0.23	39.39 + 2.61	27.81 + 1.77	1.39 + 0.29
HDL	H	2.98 + 0.87	29.74 + 0.09	21.17 + 0.49	1.83 + 0.29
	F	2.98 + 0.13	28.90 + 1.11	21.52 + 2.37	1.95 + 0.013

* Media y desviación estándar de tres repeticiones

AGL = ácidos grasos libres,

ACG = acilglicerol

H = hembras, M = machos

¹ X 10⁻³

² X 10⁻²

Los lípidos más abundantes tanto en el plasma como en la HDL son los fosfolípidos, seguido de los acilglicerol, esterol y ácidos grasos libres, además las concentraciones de los mismos son similares entre ambos sexos (Ruiz-Verdugo et al., submitted). Por sumatoria de los lípidos determinados en la HDL de camarón se calcula que la lipoproteína contiene por lo menos un 32.87% y un 43.41% de lípidos para hembras y machos, respectivamente. Estos son valores intermedios comparados con los reportados para *Cancer antenarius* con 30.7% (Sapaziani y Wang, 1991) y *Pacifastacus leniusculus* con 47.6% (Hall et al., 1995). Cabe señalar, que los valores encontrados dependen de las clases de lípidos y las técnicas utilizadas para la cuantificación, así como de las variaciones entre especies, variaciones provocadas por el clima, el estadio del animal, la temperatura e, incluso, se han reportado variaciones relacionadas con la hora del día en que se colecta la hemolinfa del animal (Vazquez-Boucard et al., 1989).

El método de ultracentrifugación también se ha utilizado para el aislamiento de la HDL del plasma de *P. californiensis* y *P. stylirostris*. La HDL de estas dos especies posee características muy similares a las de *P. vannamei*, es decir son proteínas monoméricas con polipéptidos de aproximadamente 100 kDa, glicosiladas y además, son reconocidas por anticuerpos policlonales preparados contra la HDL de *P. vannamei*.

Además de HDL, en el plasma de camarón hemos identificado otra lipoproteína con mayor densidad (>> 1.17 g/ml) por lo que la hemos considerado como VHDL. Esta lipoproteína se ha aislado también por ultracentrifugación en gradiente de densidad. La VHDL tiene una densidad de aproximadamente 1.22 g/ml y está formada por un polipéptido de aproximadamente 200 kDa unidos por puentes disulfuro y corresponde a la banda tenue localizada en el carril D de la Figura 2. Una VHDL plasmática también ha sido reportada en *P. leniusculus* y está formada por 11.4% de lípidos y un polipéptido de 210 kDa (Hall et al., 1995).

LOCALIZACION Y SITIO DE SINTESIS DE LA HDL

En los mamíferos se conoce que el hígado sintetiza y secreta algunas lipoproteínas (Lehninger et al., 1993). Ya que el hepatopáncreas realiza funciones de tipo hepáticas, y que es el principal órgano de reserva de lípidos en crustáceos (Dall et al., 1990) se investigó la presencia de la HDL en esta glándula por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-HDL. Con esta metodología fue posible detectar la HDL en el citoplasma de las células que forman la capa epitelial de los túbulos del hepatopáncreas (Figura 4).

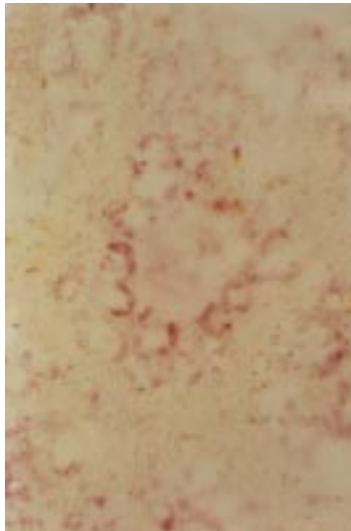


Figura 4. Detección inmunocitoquímica de la HDL en criosecciones de hepatopáncreas de *P. vannamei* (400X).

Aunque estos experimentos localizaron a la HDL en células secretoras del hepatopáncreas, no prueba de forma concluyente que la síntesis de HDL se lleva a cabo en éstas células. Para comprobar este punto, se diseñaron oligonucleótios (primers) a partir del N-terminal de la HDL. Uno de estos oligonucleótidos fue usado primeramente para producir el cDNA (DNA complementario) a partir del mRNA (RNA mensajero) por medio de la enzima transcriptasa reversa. Este cDNA fue posteriormente amplificado por la reacción de polimerasa en cadena, obteniéndose un fragmento de DNA con tamaño de aproximadamente 118 pb. Con estas dos metodologías se comprobó la presencia tanto del RNAm como de la HDL en hepatopáncreas del camarón, de donde es probablemente secretada al plasma.

Una de las principales funciones del hepatopáncreas o glándula digestiva es la secreción de enzimas digestivas (Dall et al., 1990). Entre éstas se incluyen proteasas, lipasas y colagenasas (Dall et al., 1990). En particular, la presencia de quimiotripsina ha sido localizada en las células F (Van Wormhoudt et al., 1995) y la fenoloxidasa en las células R (Yang et al., 1993). Sin embargo, en la HDL además de la síntesis del polipéptido es necesaria la incorporación de los lípidos para producir la lipoproteína completa, proceso que probablemente ocurre en el mismo tejido ya que éste es la reserva principal de lípidos en crustáceos.

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación ha sido apoyada por los proyectos 0564P-N de CONACyT y 2500-1 de International Foundation for Science, aprobados a GYP.

REFERENCIAS

- Briggs, M.R.P., Jauncey, K., and Brown, J.H. 1988. The cholesterol and lecithin requirements of juvenile prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed semi-purified diets. *Aquaculture*, 70:121-129
- Chang, E.S., and O'Connor, J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In "The Biology of crustacea"(L.H. Mantel, ed.), Vol 5. Internal Anatomy and Physiological regulation, pp 263-287. Academic Press, New York and London.
- Dall, W., Chandumpai, A. and Smith, D.M. 1993. The fate of some ¹⁴C-labelled dietary lipids in the tiger prawn *Penaeus esculentus*. *Mar. Biol.* 115:39-45.
- Dall, W.; Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. and Sharples, D.J. 1990. The biology of Penaeidae. In "Advances in marine biology" (J.H.S. Blaxter y A.J. Southward, ed.) Vol 27 pp21-29. Academic Press.
- Eldestein, C. and Scanu, A.M., 1986. Precautionary measures for collecting blood destined for lipoprotein isolation. *Meth. Enzymol.* 128:151-155
- Hall, M.; van Heusden, M. and Söderhäll, K. Identification of the major lipoproteins involved in immune recognition and clotting. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216:939-946; 1995
- Hauerland, N.H. and Bauers, W.S. 1989. Comparative studies on arthropod lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B:131-141
- Infofish. 1988. Fish feeds. INFOFISH. Marzo, 18-20.
- Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, H. L. Ryan, R. O., van Heusden, and M. C., Ziegler, R. 1990. Insect hemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22:315-320.

- Lee, R. 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 7:187-207.
- Lee, R. F. and Puppione, D. L. 1978. Serum lipoproteins in the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 59B:239-243.
- Lee, R. F. and Puppione, D. L. 1988. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the Blue Crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. *J. Exp. Zool.* 248:278-289.
- Lehninger, A., Nelson, D.L. and Cox, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*. 2nd. ed. Worth Publishers, Inc. New York, USA.
- Mathews, C.K. and van Holde, K.E. 1990. *Biochemistry*. Pp 1129. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, CA, USA.
- Mourente, G., Medina, A., González, S. and Rodríguez, A. 1994. Changes in lipid class and fatty acid content in the ovary and midgut of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiadae) during maturation. *Mar. Biol.* 121:187-197.
- Roheim, P.S., 1986. Atherosclerosis and lipoprotein metabolism. Role of reserve cholesterol transport. *Am. J. Card.* 57:3C-10C.
- Ruiz Verdugo, L.M. 1996. Caracterización lipídica del plasma y la HDL plasmática del camarón blanco. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Ruiz-Verdugo, L.M., García-Bañuelos M.L., Vargas-Albores, F. Higuera-Ciapara, I., and Yepiz-Plascencia G. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comp. Biochem. Physiol.* (submitted).
- SEMARNAP. Secretaría del Medio Ambiente de Recursos Naturales y de Pesca. (5 de marzo de 1996) Superan meta camaronera. *Imparcial*:1/E.
- Spaziani, E.; Havel, R. J.; Hamilton, R. L.; Hardman, D. A.; Stoudemire, J. B. and Watson, R. D. 1986. Properties of serum high density lipoprotein in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B:307-314.
- Spaziani, E. and Wang, W.L. 1991 Serum high density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius* III. Density gradient profiles and lipid composition of subclasses. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B:555-561.
- Stratakis, E., Fragkiadakis, G. and Carpeli-Moustazi, E. 1992. Isolation and characterization of a non sex-specific lipoprotein from the hemolymph of fresh water crab *Potamon potamios*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373:665-677.

- Teshima, S. and Kanazawa, A. 1980. Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46:57-62
- Tom, M., Shenker, O., and Ovadia, M. 1993. Partial characterization of three hemolymph proteins of *Penaeus semisulcatus* de Haan (crustacea, decapoda, penaeidae) and their specific antibodies. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B:811-816.
- Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Donval A., Palire-Goux, S. and Le Moullac G. 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea; Decapoda). *Experientia* 51:159-163.
- Vazquez-Boucard, C., Galois, R. and Ceccaldi, H.J. 1989. Variations circadiennes des lipides et lipoprotéines de l'hémolymphe, et des lipides de l'hépatopancréas, chez la crevette *Penaeus japonicus*. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 97:87-93.
- Yang, J.-S., Perng, F.S. and Marshall, M.R. 1993. Immunohistochemical localization of phenoloxidase in hepatopancreas, muscle and epidermis of grass shrimp (*Penaeus monodon* F.). *J. Food. Biochem.* 17:115-124.
- Yepiz-Plascencia, G.; Sotelo-Mundo, R.; Vazquez-Moreno, L.; Ziegler, R. and Higuera-Ciapara, I. 1995. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B:181-187.