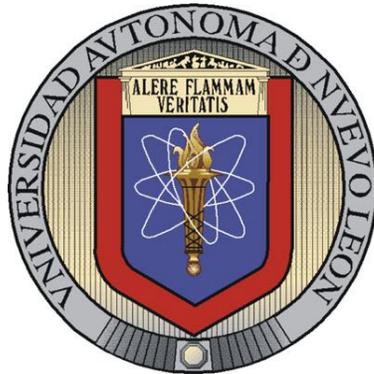


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACION DEL EFECTO DE LOS FOSFOLÍPIDOS DIETARIOS SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE DE CAMARONES *Litopenaeus stylirostris* INFECTADOS
CON *Vibrio parahaemolyticus*.**

Por

SANDRA EDITH DE LA CRUZ HERNANDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
con especialidad en
RECURSOS ALIMENTICIOS Y PRODUCCION ACUICOLA.

DICIEMBRE 2008

**EVALUACION DEL EFECTO DE LOS FOSFOLÍPIDOS DIETARIOS SOBRE
LA RESPUESTA INMUNE DE CAMARONES *Litopenaeus stylirostris*
INFECTADOS CON *Vibrio parahaemolyticus***

Comité de Tesis

Dr. Denis Ricque Marie

Director de la tesis

Dra. Martha Guadalupe Nieto López

Secretario

Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suarez

Vocal

DEDICATORIA

En memoria de mi Padre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente el apoyo, paciencia y guía que me proporcionaron mi director de tesis y asesores; Dr. Denis Ricque Marie, Dra Elizabeth Cruz Suarez, Dra. Martha Guadalupe Nieto López a ustedes gracias por ayudarme en mi crecimiento profesional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y Sala de Bioensayos del Programa de maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León que colaboraron conmigo y apoyaron para la terminación de este trabajo: Claudio Guajardo, Adriana García, Martín Camarena y Servando Quiroz.

A mi madre y hermanos, por su amor, apoyo y comprensión incondicional:

Lucía Iván y Raúl.

A todos mis amigos, Claudia, Martha, Bety, Mario, Paco que de alguna u otra manera siempre estuvieron motivándome y alentándome a seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

SECCION	PÁGINA
EVALUACION DEL EFECTO DE LOS FOSFOLÍPIDOS DIETARIOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE CAMARONES <i>Litopenaeus stylirostris</i> INFECTADOS CON <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
NOMENCLATURAS.....	x
1. RESUMEN	xii
2. ABSTRACT.....	xiii
3. INTRODUCCION	1
4. HIPOTESIS.....	4
5. OBJETIVOS	4
5.1 Objetivo General.....	4
5.2 Objetivos Particulares	4
6. ANTECEDENTES.....	5
6.1 Importancia de enfermedades bacterianas en cultivos de camarón	5
6.2 El papel de las lipoproteínas en los mecanismos de defensa inmunitaria.....	7
6.3 Importancia de los fosfolipidos dietarios en la nutrición del camarón	9
7. MATERIAL Y METODOS	11
7.1 Materias primas y dietas experimentales	11
7.1.1 Harina de Pescado.....	11
7.1.2 Pasta de Soya	11
7.1.3 Harina de Trigo.....	11
7.1.4. Análisis bromatológicos de los ingredientes.....	12
7.2 Diseño experimental	12
7.3 Dietas Experimentales	13
7.3.1 Formulación de dietas con el Mixit +2	13
7.3.2 Técnica de elaboración de las dietas.....	14

7.3.3	Análisis bromatológicos de las dietas experimentales	15
7.4	Bioensayo nutricional	16
7.4.1	Parámetros fisicoquímicos	17
7.4.2	Estado sanitario de los organismos	17
7.5	Desafío Bacteriológico.....	18
7.5.1	Activación de bacterias <i>Vibrio parahaemolyticus</i> para el desafío	19
7.5.2	Preparación del complejo nutritivo y cinética de bacterias.....	20
7.5.3	Producción de la bacteria para el desafío bacteriológico	20
7.5.4	Bacteriológico en hemolinfa	22
7.6	Parámetros bioquímicos en hemolinfa.....	23
7.6.1	Toma de hemolinfa	23
7.6.2	Cuenta total de hemocitos:.....	24
7.6.3	BGBP en plasma	24
7.6.4	Determinación de actividad Fenoloxidasa (FO)	25
7.6.5	Determinación del contenido de fenoloxidasa total (proFO+FO)	25
7.6.6	Determinación de proteína (Bradford) para paquete celular	26
7.6.7	Determinación de proteína (Biuret) para plasma	27
	Micrométodo adaptado de la técnica del Biuret (CIAD):	27
7.6.8	Determinación del colesterol en plasma	27
7.6.9	Determinación del Triglicéridos en plasma	27
7.6.10	Determinación del Lípidos Totales en plasma	27
7.7	Bioensayo de Supervivencia	28
7.8	Análisis Estadístico.....	29
8.	RESULTADOS.....	30
8.1	Dietas experimentales	30
8.2	Estado sanitario de los organismos	31
8.3	Estado de muda de los camarones experimentales.	31
8.4	Análisis de los parámetros de respuesta inmune.....	32
8.4.1	Hemocitos	34
8.4.2	BGBP	35
8.4.3	Actividad fenol oxidasas en plasma	37
8.4.4	Actividad fenol oxidasas en paquete celular	40
8.4.5	Colesterol en plasma	44

8.4.6. Triglicéridos en plasma.....	45
8.4.7. Lípidos totales en plasma.....	46
8.5 Bacteriológico en hemolinfa	47
8.6. Prueba de sobrevivencia.	48
9. DISCUSIONES.....	50
9.1 Materias primas y dietas experimentales	50
9.2 Estado sanitario de los organismos	50
9.3 Estado de muda de los camarones.....	50
9.4 Cuenta total de hemocitos	51
9.5 Concentración de BGBP en plasma	52
9.6 Actividad de fenol oxidasa en plasma.....	52
9.7 Actividad FO paquete celular	52
9.8 Bacteriológico en hemolinfa	54
9.9 Bioensayo de Supervivencia	54
10. CONCLUSIONES	56
LITERATURA CONSULTADA	58
APENDICE 1.....	61
EVIDENCIA DE PUBLICACION: RESUMEN DEL POSTER PRESENTADO EN EL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICION ACUICOLA, 19-22 DE NOVIEMBRE 2000, MERIDA YUCATAN. PUBLICADO EN EL LIBRO DE PROGRAMA Y RESUMENES.	61

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Composición proximal de la harina de pescado original y delipidada	11
Tabla II. Diseño experimental.....	13
Tabla III. Composición de las dietas (g/kg de mezcla).....	15
Tabla IV. Parámetros fisicoquímicos del agua de acuarios	17
Tabla V. Composición proximal de las dietas experimentales, estabilidad en el agua y contenido energético	30
Tabla VI. Estado de muda de los camarones	31
Tabla VII. Parámetros bioquímicos evaluados en plasma y paquete celular	33
Tabla VIII. Análisis de varianza factorial del número de hemocitos - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo.....	35
Tabla IX. Análisis de varianza factorial de BGBP - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo.	36
Tabla X. Análisis de varianza factorial de actividad enol oxidasa en plasma- efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo.	38
Tabla XI. Análisis de varianza factorial de actividad fenol oxidasa en paquete celular - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo	41
Tabla XII. Análisis de varianza factorial de colesterol en plasma - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo.....	44
Tabla XIII. Análisis de varianza factorial de triglicéridos en plasma - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo.....	45
Tabla XIV. Análisis de varianza factorial de lípidos totales en plasma - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo	47
Tabla XV. Mortalidad de camarones durante la prueba de sobrevivencia.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva estándar <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	22
Figura 2. Estados de muda de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	32
Figura 3. Cinética de hemocitos en hemolinfa de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	35
Figura 4. BGBP en hemolinfa de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	36
Figura 5. BGBP en hemolinfa de camarones desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	36
Figura 6. Cinética de actividad Fenol oxidasa en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	38
Figura 7. Cinética de actividad Fenol oxidasa total en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	38
Figura 8. Cinética de pro-fenol oxidasa en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	39
Figura 9. Cinética de FO/FOT en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	39
Figura 10. Cinética de fenol oxidasa en paquete celular de camarones alimentados con y sin Fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	42
Figura 11. Cinética de fenol oxidasa total en paquete de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	42
Figura 12. Cinética de pro-fenol oxidasa en paquete celular de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	43
Figura 13. Cinética de FO/FOT en paquete celular de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	43
Figura 14. Cinética de colesterol en hemolinfa de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	45
Figura 15. Triglicéridos en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	46
Figura 16. Lípidos totales en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con <i>Vibrio</i>	47
Figura 17. Unidades formadoras de colonias en hemolinfa de camarones desafiados.	48
Figura 18. Unidades formadoras de colonias en el agua de acuarios desafiados en el bioensayo para determinar sobrevivencia.	48
Figura 19. Sobrevivencia de camarones después del inoculo bacteriano.	49

NOMENCLATURAS

Abs	absorbancia
AG	ácidos grasos libres
Aepfo	enzima activadora del la profenoloxidasa
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
BGBP	beta glucan binding protein (Proteína ligante de Beta glucanos)
Ca	calcio
Cfu/mL	unidades formadoras de colonias por mililitro
Co	cobalt
Col	colesterol
DABs/min/ml Delta	absorbancia/minuto/mililitro
ELN	extracto libre de Nitrógeno
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay
ETQ	etoxiquin
Fe	fierro
FO	fenoloxidasa (E.C.1.14.18.1; o-difenol:oxígeno óxido-reductasa)
FO PTE	fenoloxidasa en paquete celular
FOT	fenoloxidasa total
FOT PTE	fenoloxidasa total en paquete celular
g	gramos
g/ml	gramos por mililitro
g/L	gramos por Litro
HDL	lipoproteinas de alta densidad
Hrs	horas
I	iodo
IU/kg	unidades internacionales por kilogramo
kCal	kilocalorías
L	litros
Mg	magnesio
mg/dL	miligramo por decilitro
mg/L	miligramos por Litro
ml	mililitros
min	minutos
Mn	manganeso
nm	nanómetros
PC	fosfatidilcolina
1.5% PC	dieta con fosfatidilcolina al 1.5%
3% PC+	dieta con fosfatidilcolina al 3.0%
Pls	fosfolípidos
pH	potencial de hidrogeno
proFO	profenoloxidasa
PFO	profenoloxidasa
‰	partes por mil
ppm	partes por millón
%	porciento
Se	selenio

SIC	solución isotónica para camarón
SPLS	dieta sin fosfolípidos
°C	grados Celsius
μl	microlitros
Zn	zinc

1. RESUMEN

El presente estudio se emprendió para evaluar los efectos de la suplementación de fosfatidilcolina en dietas para camarón azul *Litopenaeus stylirostris* esperando con esto demostrar una mejoría en la capacidad de respuesta del sistema inmunológico y la sobrevivencia ante un desafío infeccioso con *Vibrio parahaemolyticus*. Tres grupos de 120 juveniles tempranos de *Litopenaeus stylirostris* (0.4- 0.7 g) fueron alimentados dos veces al día con una ración fija (5% de biomasa) de la siguientes dietas experimentales dieta control deficiente en fosfolípidos (incluyendo una harina de pescado delipidada) y 2 dietas suplementadas con fosfatidilcolina 1.5 % y 3%. Después de alimentar 11 días se extrajeron de cada grupo de alimentación 14 subgrupos de tres camarones que fueron alojados en tanques de 10 litros por 24 hrs antes de ser sometidos (10 grupos) o no (4 grupos) a un desafío bacteriológico por inoculación en el agua (*Vibrio parahaemolyticus* 0.5×10^9 cfu/mL). Se tomaron muestras de hemolinfa a las -24 hrs, 0 hrs, +30 min, +90 min y +260 min con respecto al momento de inoculación, para determinar el numero de hemocitos, las concentraciones plasmáticas de proteína ligante de beta glucanos (BGBP), colesterol, triglicéridos y lípidos totales, así como la actividad fenoloxidasa (FO), fenoloxidasa total, y la profenol oxidasa inactiva proPFO en el plasma y en los hemocitos. A los 14 días 10 grupos de 3 camarones fueron extraídos de nuevo de los grupos de alimentación para ser sometidos (7 grupos) o no (3 grupos) a otro desafío bacteriológico, y las mortalidades fueron registradas sobre 48 h. Se observó un ligero aumento de la concentración de BGBP en los camarones desafiados (no significativo estadísticamente), mientras la suplementación con fosfatidilcolina no tuvo efecto. De los otros parámetros sanguíneos, solo la concentración total de lípidos fue afectada por la suplementación con la fosfatidilcolina siendo el valor mas alto con el nivel de 1.5 %. Sin embargo, el bioensayo de sobrevivencia demostró claramente el efecto protector del suplemento de fosfatidilcolina (sobrevivencia del 80% para las dos niveles de suplementación) mientras la mortalidad fue total en 24 hrs en los camarones alimentados con la dieta control deficiente en fosfolípidos.

2. ABSTRACT

The present study was undertaken to evaluate the effects of phosphatidyl-choline supplementation in diets for the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*, in intent to demonstrate a stimulation of the immunological system and a better survival of the shrimp when submitted to an infectious challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. Three groups of 120 *L. stylirostris* early juveniles (0.4-0.7g) were fed twice a day a fixed ration (5% of biomass) of the following experimental diets: a phospholipid deficient control diet (including delipided fish meal) and two test diets supplemented with 1.5 or 3% phosphatidyl-choline. At 11 days feeding, 14 groups of 3 shrimp were extracted from each feeding group, stocked for 24h in 10L tanks, and submitted (10 groups) or not (4 groups) to a bacterial challenge by inoculation in water (*Vibrio parahaemolyticus* 0.5×10^9 cfu/mL). Hemolymph samples were taken at -24h, 0h, +30min, +90min, +180min and +260 min with respect to the inoculation time, in order to determine the hemocytes count, plasmatic concentrations of beta-glucan-binding-protein (BGBP), cholesterol, triglycerids and total lipids, as well as phenol-oxidase activity (FO), total phenol-oxidase activity and inactive proFO in plasma or hemocytes. At 14 days feeding, 10 groups of 3 shrimp were extracted from the feeding groups to be submitted (7 groups) or not (3 groups) to another bacterial challenge, and mortality was monitored during 48 hours. BGBP plasmatic concentrations increased slightly in the shrimps challenged against *Vibrio* (not statistically significant), while PC supplementation had no effect. From the other parameters, total lipids concentration was the only one to be significantly affected by the phosphatidyl-choline supplementation, the value being higher with the 1.5% level. However, survival to the second bacterial challenge showed a clear cut effect, with survival about 80% for both supplemented levels, while mortality was total within 24 hours for the shrimp fed the phospholipid deficient diet.

3. INTRODUCCION

Los invertebrados carecen de un sistema inmune mediado por anticuerpos, pero poseen un sistema de protección que incluye lisis y aglutinación mediada por componentes humorales y celulares; no poseen inmunoglobulinas, aún así son capaces de reconocer y destruir los microorganismos invasores o parásitos.

Este sistema no está mediado por anticuerpos pero se han detectado proteínas como aglutininas y lipoproteínas como la BGBP (Beta glucan binding protein = proteína ligante de beta glucanos), las cuales cumplen con una función de reconocimiento. Las lipoproteínas de tipo BGBP, al ligarse con los glucanos de algún microorganismo provocan la activación de cierto tipo de hemocitos, con lo cual los componentes del sistema inmunitario pueden adquirir su actividad biológica y colaborar en la defensa contra los microorganismos. Aunque las lipoproteínas tipo BGBP de los camarones cumplen con una función de reconocimiento similar a las de las inmunoglobulinas, esta función es incompleta ya que se limita a las moléculas características de bacterias o levaduras y, sobre todo, carece de la memoria que permite a los vertebrados producir inmunoglobulinas con más eficiencia al momento del segundo contacto con el antígeno. Estas mismas lipoproteínas además tienen un papel importante en el transporte de triglicéridos y colesterol en la hemolinfa.

La nutrición es fundamental para el buen funcionamiento del sistema inmunitario; por ejemplo el aporte dietario de los fosfolípidos precursores de

lipoproteínas, BGBP particularmente, podría aumentar la eficiencia de respuesta inmune (Vargas-Albores *et al.*, 1996).

Los niveles de lípidos plasmáticos en crustáceos son relativamente bajos (aproximadamente 1%), sin embargo, ocupan el segundo lugar en concentración entre los componentes del plasma siendo superados sólo por las proteínas. En *Penaeus japonicus* se ha indicado que los fosfolípidos (PLs) en la hemolinfa llegan a constituir hasta el 88 % de la composición de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Se estima que 1/3 del requerimiento de fosfolípidos es cubierto por los fosfolípidos inherentes en la dieta y 2/3 se tienen que añadir en forma de lecitina de soya. El efecto benéfico de la adición de fosfolípidos en la dieta ha sido demostrado en diferentes especies de camarones peneidos incluyendo *P. vannamei*. Cruz y colaboradores (1996) experimentaron con *P. vannamei* diversas dietas conteniendo diferentes niveles de fosfolípidos (lecitina de soya líquida y granulada; y lecitina de calamar) encontrando que la lecitina líquida al 7%, sin aporte de aceite de pescado, proporcionó el mayor efecto en cuanto a la tasa de crecimiento (49% más que el control), tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia.

Otros autores han encontrado que el usar fosfatidilcolina (PC) de soya al 1.5% de la dieta en larvas de *P. japonicus* y *P. vannamei* mejora el crecimiento y la sobrevivencia así como incrementa la resistencia al estrés causado por un cambio brusco de salinidad.

Teshima en 1986 demuestra que el nivel de Pls en hepatopáncreas y hemolinfa del camarón aumenta con el contenido de Pls en la dieta. Es posible que esto aumente al mismo tiempo el contenido de lipoproteínas reconocedoras de antígenos en la hemolinfa y que con ello se mejore la respuesta inmune. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado ningún estudio donde se demuestre el efecto de los fosfolípidos dietarios, sobre la respuesta inmune de los camarones.

4. HIPOTESIS

La adición de PC en las dietas para camarón *Penaeus stylirostris* aumenta el contenido de lipoproteínas de tipo BGBP, de colesterol y la actividad de FO en plasma. Al mismo tiempo cuando éstos organismos son desafiados con *Vibrio parahaemolyticus* la respuesta inmune es más eficiente y la sobrevivencia es mejorada.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo General*

El objetivo de este trabajo fue aumentar la concentración de lipoproteínas plasmáticas de reconocimiento a través de la inclusión de fosfolípidos dietarios que funcionarían como precursores, esperando con ello aumentar la velocidad y capacidad de respuesta del sistema inmunológico del camarón contra agentes bacterianos infecciosos (*Vibrio parahaemolyticus*), a través de bioensayos nutricionales y exposición de los camarones a este agentes bacteriano.

5.2 *Objetivos Particulares*

1. Determinar la variación postprandial de la lipoproteína BGBP, colesterol, actividad de FO y proFO en plasma de camarón *Litopenaeus stylirostris* por la ingestión dietaria de PC.
2. Determinar la sobrevivencia de *Litopenaeus stylirostris* alimentados con dietas con dos niveles de PC, sometidos a desafíos bacteriológicos con *V. parahaemolyticus*.

6. ANTECEDENTES

6.1 Importancia de enfermedades bacterianas en cultivos de camarón

La presencia de bacterias patógenas en los cultivos de camarones peneidos es un factor importante, que puede afectar seriamente la producción del camarón, tanto en los laboratorios de crianza de larvas como en los estanques de engorda de juveniles.

A nivel de cultivo larvario, entre las varias enfermedades atribuidas a bacterias, se reporta el síndrome de las bolitas (células descamadas del epitelio intestinal que se encuentran libres en el lumen del tracto digestivo), que se asocia con la presencia de bacterias del genero *Vibrio*, que Lightner (1993) presenta como bacterias comunes que son parte de la flora normal asociada a los camarones peneidos, aunque para varias especies se han reportado comportamientos típicos de organismos patógenos reales, mas que oportunistas.

En los últimos años las epidemias atribuidas a *Vibro spp* pueden ser un factor significativamente limitante en los laboratorios de producción de larvas, causando altas mortalidades de tanques cultivados en ciertas áreas del sur de América (Brock and Main 1994). El género *Vibrio* ha causado grandes crisis en la producción de camarón como es el caso presentado en Ecuador en 1989, cuando el ataque de bacterias oportunistas fue favorecido por la presencia de gregarinas las cuales invadían al tracto intestinal de camarón causando lesiones.

Existen numerosos estudios realizados para *Vibrio* investigando aspectos de su patogenicidad en peneidos y están enfocados principalmente a las características que causan la enfermedad, las condiciones que implican mortalidades en estanques de cultivo, además de los posibles controles químicos (Baticados *et al.*, 1990; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; de la Peña, 1993; Monhey *et al.*, 1994).

La infección por *Vibrio* está asociada con daños a intestino, branquias y cutícula (Lightner *et al.*, 1990) y puede ser el resultado del estrés, cambios ambientales extremos, deficiencias nutricionales, cambios bruscos de temperatura, manejo de altas densidades en estanquerías, y secundariamente por otros patógenos o más formas altamente virulentas u otros microbios, daños en la cutícula entre otros (Mohney *et al.* 1994). Los signos presentes en los organismos se pueden identificar como tracto digestivo vacío, encogimiento del hepatopáncreas que puede presentar uno o más nódulos hemocíticos melanizados, heridas melanizadas en los apéndices o en la superficie del cuerpo,

El control de las enfermedades bacterianas es un punto de riesgo mayor ya que su impacto sobre la producción ha sido importante cada vez que aparecen condiciones estresantes en el cultivo; es por eso que se considera necesario incrementar el conocimiento del mecanismo inmune involucrado para poder dar respuesta a la gran demanda del sector productivo.

6.2 El papel de las lipoproteínas en los mecanismos de defensa inmunitaria.

En los invertebrados no existe la adaptación de la respuesta inmune con inmunoglobulinas verdaderas sino un sistema no específico de reconocimiento de microorganismos patógenos y parásitos y un sistema de respuesta inmune primitivo basado en las reacciones de defensa de los hemocitos mediante los procesos de adhesión, encapsulación, fagocitosis, formación de nódulos y coagulación celular. Este sistema de reconocimiento y actividad celular es mediado por la actividad del sistema profenoloxidasa de la hemolinfa y las reacciones de defensa son acompañadas por melanización (Söderhall K., 1982; Ractiffe *et al.*, 1991; Söderhall K. and Smith, 1986; Söderhall K. *et al.*, 1990). La enzima responsable de la síntesis de los pigmentos de melanina e intermediarios es la Fenoloxidasa (PO); esta existe en la hemolinfa de artrópodos como precursor (proPO), almacenada en forma inactiva en el citoplasma de los hemocitos de tipo granular.

Durante la conversión de proPO a fenoloxidasa, los factores de reconocimiento son incrementados en las células (granulares) las cuales incrementan a su vez la fagocitosis y la encapsulación. Se sabe que las proteínas asociadas con el sistema de proPO han sido directamente involucradas en la comunicación entre los hemocitos y también en la eliminación de partículas extrañas (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 1998).

El modelo de activación de la proPO propuesto por Johansson y Söderhall K. (1989) involucra una estimulación a través de la membrana celular de estos hemocitos, la cual se puede llevar a cabo por moléculas plasmáticas reconocedoras de los peptidoglicanos y lipopolisacaridos de la pared celular de bacterias así como por los β 1-3 glucanos que se encuentran en hongos, levaduras y algas (Smith y Söderhall K. 1983). Los hemocitos estimulados liberan el contenido granular (degranulación) y la proPO es convertida en la enzima denominada fenoloxidasa por intervención de proteinasa llamada enzima activadora de la proPO; durante la degranulación, el sistema proPO y factores asociados como la proteína de adhesión 76 kDa son liberados en una forma biológicamente inactiva y son activados en presencia de polisacaridos microbiales como 1,3- β -D-glucanos o lipopolisacaridos (LPS). Como consecuencia de esta activación los componentes de proPO pueden adquirir su actividad biológica y colaborar en una defensa contra los microorganismos promoviendo la fagocitosis y encapsulación por las células de la sangre. La fenoloxidasa genera la formación de melanina y productos intermedios, los cuales tienen efectos antibacterianos, pero también aumentan la actividad fagocítica y fortalecen el sistema de defensa al estimular otras actividades; la respuesta se magnifica y contribuye a la eliminación del parásito o sustancia extraña.

Recientemente se ha documentado la existencia de moléculas llamadas BGBP y LGBP (por sus siglas en ingles “Beta Glucan binding Protein” y “Lipopolysaccharides and Glucan binding Protein”), lipoproteínas que reconocen lipopolisacaridos y 1,3- β -D-glucanos (Vargas-Albores y Yepiz-Plascencia, 2000; Cheng et al., 2005). La unión de estas moléculas de reconocimiento con los peptidoglucanos y lipopolisacaridos forma un

complejo que puede ser reconocido por los hemocitos, generando la activación celular mencionada arriba, con liberación de moléculas efectoras como la proPO.

Los métodos para evaluar la BGBP han sido desarrollados en México en el centro de Investigación y Desarrollo (CIAD) en Hermosillo, Sonora (Vargas-Albores et al., 1996; Vargas-Albores et al., 1997).

6.3 Importancia de los fosfolípidos dietarios en la nutrición del camarón

Teshima (1986) asume que los fosfolípidos dietarios proveen clases de lípidos como sustrato para la formación de lipoproteínas y tienen una función importante en la digestión (emulsificación), absorción y transporte de lípidos en la hemolinfa. Aunque los crustáceos son capaces de sintetizar Pls, la tasa de síntesis es menor a la demanda metabólica, especialmente durante el crecimiento larvario (D'Abramo, 1997), por lo que deben suministrarse en la dieta. La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más efectivo y se recomienda un nivel de 1 a 1.25% en dietas para camarón lo cual proporciona óptimos resultados en términos de crecimiento, TCA y sobrevivencia. El nivel de fosfolípidos (Pls) totales recomendados en dietas para camarón es de 2%. Sin embargo, si se utiliza PC, esta recomendación se reduce a 1% (Akiyama *et al.*, 1989).

El añadir 3% de lecitina de soya en las dietas incrementó la concentración de los lípidos (triglicéridos, colesterol y PC) en el hepatopáncreas y hemolinfa (Teshima, *et al.* 1986b en Teshima 1986). Por lo tanto se propuso en la presente investigación dos tratamientos dietarios con niveles de 1.5 y 3% de PC, suplementada en una dieta control

experimental formulada con harina de pescado delipidada de tal manera que esta dieta control sea deficiente en fosfolípidos.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 Materias primas y dietas experimentales

7.1.1 Harina de Pescado.

Se utilizó una harina de pescado (jurel) chilena Tepual® tratada con antioxidante la cual fue obtenida de una planta procesadora que posee un buen control de calidad (Galleguillos com. Per., julio, 1998) y seleccionada por fundación Chile. El lote de harina fue recibido por el programa Maricultura de la F.C.B./U.A.N.L en marzo de 1997. Esta harina fue delipidada por la Técnica descrita por Domínguez (1995).

Tabla I. Composición proximal de la harina de pescado original y delipidada

Bromatológico %	Harina Pescado B9274	Harina delipidada
Base húmeda		
Materia seca	92.1	84.7
Proteína	67.1	70.5
Lípidos	9.2	0.6
Ceniza	14.0	12.8
Humedad	7.9	15.3

7.1.2 Pasta de Soya

La pasta de soya utilizada en las dietas presentó 46% de proteína, fue obtenida de un establecimiento comercial de la ciudad de Monterrey, N.L. y posteriormente se almacenó a temperatura ambiente en el laboratorio hasta su uso.

7.1.3 Harina de Trigo

Se adquirió la harina de trigo duro (variedad Manitoba) de molinos Sant Joan, Corp. Bimbo de la ciudad de Monterrey, N.L. y se almacenó a temperatura ambiente en el laboratorio hasta su uso.

7.1.4. Análisis bromatológicos de los ingredientes

Cada uno de los ingredientes utilizados en la elaboración de las dietas se analizó químicamente en el Laboratorio de maricultura mediante los siguientes métodos de análisis descritos por la A.O.A.C. (1990) en el cual se determinan en base húmeda: Proteína (Tecator, 1987), Húmedad (A.O.A.C., 1990, No. 920.36), Ceniza (A.O.A.C., 1990, No. 942.05), Lípidos (Tecator, 1983), Fibra cruda (A.O.A.C., 1990, No. 929.09) y extracto Libre de Nitrógeno (diferencia).

A la harina delipidada se le hizo un bromatológico para asegurar el contenido de lípidos contenidos.

7.2 *Diseño experimental*

De acuerdo con los objetivos planteados se aplicó el siguiente diseño experimental.

1. Se diseñaron 3 dietas con 0, 1.5 y 3% de fosfatidilcolina.. (tabla II)
2. Bioensayo nutricional: Se alimentaron tres grupos de 120 camarones cada uno con las diferentes dietas por 11 días (en 3 tanques de 500 lts.).
3. Desafíos bacteriológicos: Posteriormente se distribuyeron los camarones en acuarios de 10 lts. con dos propósitos: primero colectar hemolinfa para establecer cinéticas de parámetros de respuesta inmune; segundo monitorear la mortalidad en un bioensayo de sobrevivencia donde no se realizaron tomas de hemolinfa para no influir en la mortalidad.
 - 3.1 Cinética de respuesta inmune: a los 11 días de alimentación con las dietas experimentales, se seleccionaron 42 camarones por cada grupo de alimentación y se distribuyeron 3 camarones por acuario en 14 acuarios destinados a recibir el inóculo bacteriano (10 acuarios desafiados por dieta) o no (4 acuarios no desafiados por dieta).

3.2 Bioensayo de sobrevivencia: a los 14 días de alimentación, se seleccionaron 30 camarones de cada grupo de alimentación y se distribuyeron en 7 acuarios desafiados y 3 acuarios no desafiados (3 camarones por acuario) y se monitoreo la mortalidad durante 48 horas.

Tabla II. Diseño experimental

NIVEL DE INCLUSION DE FOSFATIDILCOLINA	BIOENSAYO	TRATAMIENTOS DESAFIADOS	TRATAMIENTOS NO DESAFIADOS (CONTROLES)
PC (120)	Respuesta inmune (42)	Camarones Desafiados 3 x 10 acuarios	Camarones NO Desafiados 10 x 4 acuarios
	Sobrevivencia (30)	Camarones Desafiados 3x 7 acuarios	Camarones NO Desafiados 10 x 3 acuarios
PC 1.5 % (120)	Respuesta inmune (42)	Camarones Desafiados 3 x 10 acuarios	Camarones NO Desafiados 10 x 4 acuarios
	Sobrevivencia (30)	Camarones Desafiados 3x 7 acuarios	Camarones NO Desafiados 10 x 3 acuarios
PC 3% (120)	Respuesta inmune (42)	Camarones Desafiados 3 x 10 acuarios	Camarones NO Desafiados 10 x 4 acuarios
	Sobrevivencia (30)	Camarones Desafiados 3x 7 acuarios	Camarones NO Desafiados 10 x 3 acuarios

() = numero de camarones

7. 3 Dietas Experimentales

7.3.1 Formulación de dietas con el Mixit +2

Se formularon las dietas experimentales (Tabla III) por medio del software computacional mixit-2, siguiendo las recomendaciones nutricionales de Tacon (1987), Akiyama (1988) y Cruz-Ricque (Comunicación personal)

Para la elaboración de las dietas se utilizó el siguiente criterio:

La inclusión de la PC se realizó en sustitución de parte del aceite de soya. Los niveles de suplementación fueron 1.25 y 2.75%, tomando en cuenta un residual de 0.25% en la dieta SPLS, para lograr un total 1.5 y 3% en las dietas.

Todos los ingredientes se incluyeron en las dietas a un nivel constante, (ver tabla III).

Los niveles de harina de trigo y de pasta de soya se balancearon para que sumando sus aportes de proteína a los del pescado y gluten, se logre un nivel total del 36% de proteína y se cubrieran los requerimientos de aminoácidos.

Se moduló el nivel de aceite de pescado para completar el aporte total de lípidos aproximadamente a un valor de 8%.

7.3.2 Técnica de elaboración de las dietas.

La elaboración de las dietas experimentales se realizó en el Laboratorio de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se prepararon 2 Kg de cada una de las dietas experimentales. Todos los ingredientes se molieron (500 μ) para obtener una consistencia fina y uniforme para poder tener un buen mezclado.

Los ingredientes mayores pesados de acuerdo a su nivel de inclusión en la formulación se mezclaron durante 10 minutos en una batidora Kitchen Aid de 5 Kg de capacidad, mientras los ingredientes menores se mezclaron aparte hasta obtener una mezcla de color homogéneo. A esta mezcla se agregó poco a poco la mezcla de los ingredientes mayores para poder obtener una buena homogeneización. Posteriormente se agregaron los aceites (aceite de pescado y aceite de soya), la fosfatidilcolina que fue diluida un poco con el homogenizador, por último se agregó el agua caliente (30% del peso total de la mezcla). Inmediatamente después de agregar el agua, se procedió a la fabricación de los pellets (diámetro de 1.6 mm) Estos se procesaron por medio del

método de extrusión húmeda, utilizando un molino de carne (Hobart) y se secaron en la estufa a 100 °C, 8 minutos, y se dejó enfriar una noche a temperatura ambiente.

Finalmente, las dietas se conservaron en recipientes herméticamente cerrados y en refrigeración a 4°C.

Tabla III. Composición de las dietas (g/kg de mezcla)

INGREDIENTES	DIETA SPLS	DIETA PC 1.5%	DIETA PC 3%
Aceite de pescado	10	10	10
Aceite de soya	85	70	55
Harina de trigo	405	405	405
Pasta de soya	150	150	150
Harina de pescado delipidada	237.9	237.9	237.9
Glúten de trigo	80	80	80
Microingredientes	32.1	32.1	32.1
PC	0.0	15	30

Micro ingredientes: monofosfato de sodio 1.5%, metionina 0.14%, antioxidante (ETQ)0.02%, antifungico (checkmold®) 0.05%, minerales 0.25%, vitaminas 0.25%, atractante (F.P)0.5% y colesterol al 0.5%.

Mezcla de vitaminas: Vit.A 1,000 000 IU/Kg., Vit.B₁ 6,000ppm, Ca Pant. 1,500ppm, Vit.B₆ 1,500ppm, Vit B₁₂ 20ppm, Vit C 10,000ppm, CP y P 10,000ppm, Vit. K₃ 4,000ppm, Vit D₃ 800,000IU/Kg., Vit.E 15,000ppm, Vit. K 100ppm, Niacina 2,500 ppm, Ac.Folico 1,000 ppm.

Mezcla Minerales: Co 500 ppm, Mg 0.0001%, Mn 4,000 ppm, Zn 10,000 ppm, Ca 5,000 ppm, Fe 0.25 ppm, I 500 ppm y Se 25 ppm.

7.3.3 Análisis bromatológicos de las dietas experimentales

Se hicieron análisis proximales en las dietas con los métodos descritos anteriormente para los ingredientes. Además, la concentración de Pls en dietas fue determinada usando un método colorimétrico indirecto, midiendo el fósforo en el extracto lipídico (según la AOAC 1996, método 949.07 Lecithin in Cacao Fat).

Se realizaron pruebas de lixiviación de cada una de las dietas aplicando el método Aquacop (1978) modificado por Cruz-Ricque (1987), con la finalidad de determinar la pérdida de materia seca, utilizando agua marina sintética con temperaturas ente 24 y 27 °C, salinidad de 35‰. Para estas pruebas se utilizó agua con un sistema de recirculación con las mismas cantidades de pH, amonio, nitritos y oxígeno disuelto que las reportadas durante el bioensayo (Ver la tabla IV).

7.4 Bioensayo nutricional

Este se realizó en la sala de Bioensayos del Laboratorio de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

Para el experimento se utilizaron juveniles de camarón azul *L. stylirostris* de un peso promedio de 0.5-0.7 g los cuales procedían de una granja de Guasave, Sin.

Los camarones a su llegada a la sala se aclimataron por 3 días en 1 de los tanques de 500 l donde se les proporcionó como alimento una dieta comercial (Rangen®, 35 % de proteína). Se realizó un muestreo preliminar el cual permitió elegir los rangos de tallas del camarón para ser usados en el bioensayo. En cada tanque experimental de 500 lts, se distribuyeron 120 camarones, tomados dentro de las siguientes clases de tallas: 400-500 mg, 500-600 mg, y 600-700 mg.

Al día siguiente los tratamientos fueron distribuidos al azar a las unidades experimentales (3 tanques de 500 L) y se inicio la alimentación. Se alimentaron dos veces por día racionando al 5% de la biomasa de los tanques durante 11 días con las dietas experimentales 0% Pls, 1.5 % de PC y 3% de PC.

Se registró diariamente por la mañana los restos de alimento y la mortalidad, para posteriormente sifonear el fondo de los tanques. Durante el bioensayo se mantuvo un fotoperiodo de 12 horas luz.

7. 4.1 Parámetros fisicoquímicos

Durante el desarrollo del bioensayo nutricional se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos del agua de los acuarios:

Tabla IV. Parámetros fisicoquímicos del agua de acuarios

Diariamente	Salinidad (refractómetro)	Temperatura (Termómetro)
Semanalmente :	pH, colorimétricos de nitritos*	
	Amonio (Test colorimétricos de Aquarium System)	
	Nitritos (Test colorimétricos de Aquarium System)	
	Nitratos (Test colorimétricos de Aquarium System)	

* LaMotte, Chestertown, Maryland 21620, EUA

Los parámetros de calidad del agua en los acuarios se mantuvieron dentro del estándar de calidad recomendados para esta especie registrándose valores de temperatura de agua de 27-33 °C, salinidad de 32-36 g/L , pH 8, NH₃ 0.01-0.06 ppm, NO₂ 1.5 ppm, N-NO₃ 36-40 ppm, O₂ 2.8-4.3 mg/L.

7.4.2 Estado sanitario de los organismos

Al inicio del bioensayo nutricional, antes de empezar a distribuir a los organismos entre los distintos acuarios, se tomó una muestra de individuos (5 - 7 organismos), se etiquetaron, y fijaron con la solución de RF-Davidson. A las 24 horas de haberlos fijado, se transfirieron a etanol 50% y posteriormente fueron enviados por mensajería a la Universidad de Arizona para ser analizados histopatológicamente, para verificar que los animales estuvieran libre del Síndrome de Taura (TSV), utilizando la técnica de hibridización *in situ* (Shrimp probe Diagxotics).

7.5 Desafío Bacteriológico

El desafío bacteriológico se llevo a cabo en un anexo de sala de bioensayos de la UANL al finalizar el bioensayo nutricional.

Se acondicionaron acuarios pequeños (10 Litros) en los cuales se distribuyeron los organismos después de haber sido sometido a las diferentes dietas experimentales. Se colocaron 3 camarones en un volumen de 7 litros y se inocularon 34×10^{11} ufc de *Vibrio*.

Se utilizaron 10 replicados para cada uno de los tratamientos (30 acuarios) que serían desafiados, mientras que para los animales no desafiados se utilizaron 4 replicados (acuarios) para cada uno de los tratamientos.

No se realizo recambio de agua durante el desafío y la aireación se mantuvo constante, se alimentó un solo día en estos acuarios suministrando un pellet por camarón de acuerdo al tratamiento correspondiente.

Los camarones se muestrearon para llevar a cabo la determinación de parámetros bioquímicos de respuesta inmune en hemolinfa (proteínas para calculo de actividades específicas de fenoloxidasa y profenoloxidasa, cuenta total de hemocitos, colesterol, lípidos totales y triglicéridos) a las -24hrs, 0hrs, 30min , 90 min, 180 min y 260 min de haber sido expuestos al patógeno (cinéticas de respuesta inmune).

La unidad estadística muestral fue el individuo (3 camarones replicados por muestra). En cada tiempo de muestreo se sacrificaron los 3 camarones de un acuario

(uno de los 10 replicados) para extraer muestras de hemolinfa,;se verificó después el estado de muda de los camarones expuestos al desafío así como también los no desafiados. Una vez extraída la hemolinfa, el camarón fue pesado, se cortaron los urópodos, los cuales se guardaron en SIC-EDTA para evitar desecación y verificar posteriormente en el mismo día su estado de muda, observando las setas de los urópodos para determinar el estado de muda empleando la metodología citada en Drach and Tchernigovtzeff (1967).

También se destinaron dos replicados para histológicos y otros para el análisis de la eliminación de bacterias de la hemolinfa (Bacterial Clearance).

7.5.1 Activación de bacterias *Vibrio parahaemolyticus* para el desafío

La cepa pura bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus* proveniente de una epizootia que se desarrolló en una granja de camarón en las costas de Nayarit, México en 1998, fue proporcionada por el Laboratorio de Sanidad Acuícola de la U.A.N.L.

La cepa se activó a partir de un tubo de agar soya tripticaseína, el cual se mantuvo en refrigeración a -5° C hasta su reactivación.

Las bacterias fueron activadas en agar soya tripticaseína e inoculadas y sembradas en un agar nutritivo. Para la producción de biomasa se utilizó un complejo nutritivo para posteriormente ser inoculadas en camarones *L. stylirostris* para asegurarnos de su actividad y patogenicidad.

Para la activación bacteriana colocamos tres acuarios con 4 camarones e inoculamos cada uno con 50 ml de un cultivo bacteriano previamente cultivado en complejo

nutritivo a 29 °C con agitación. Después fue aislado nuevamente el *Vibrio parahaemolyticus* de la hemolinfa en agar TCBS para posteriormente ser utilizada en el desafío bacteriológico.

7.5.2 Preparación del complejo nutritivo y cinética de bacterias

El medio de cultivo para *Vibrio* fue preparado los siguientes reactivos: 5 g bacto peptona, 3 g extracto de levadura, 5 ml glicerol, 750 ml de agua salada, y 250 ml de agua destilada, ajustado al pH 7.3. Se disolvieron los reactivos en agua destilada, se ajustó el pH, se esterilizó y se colocó en matraces.

Para el conteo bacterial se hizo una cinética de crecimiento para medir la densidad óptica a distintas horas después de la inoculación en el complejo nutritivo (con un espectrofotómetro), y de esta manera saber la cantidad de bacterias que estamos inoculando en los acuarios. Esta cuenta bacteriana se corroboró en placas de agar TCBS.

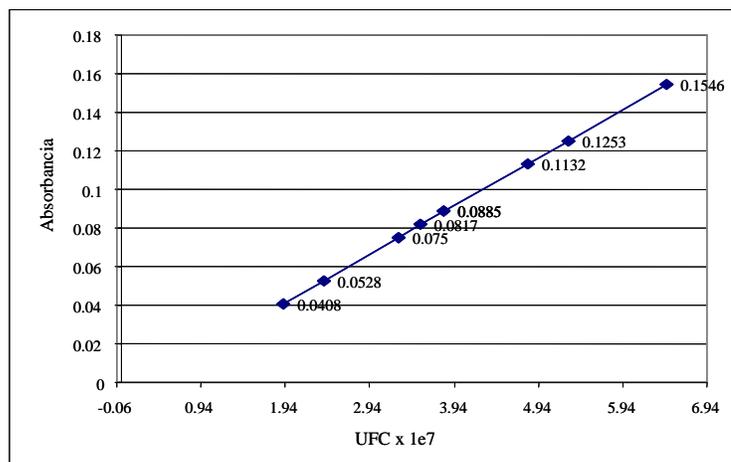
7.5.3 Producción de la bacteria para el desafío bacteriológico

Una vez activada la cepa (para asegurar su patogenicidad), se mantuvo en un tubo de agar Soya Trypticaseína + 2.5% de NaCl inclinado a 4°C. Este tubo se sacó del refrigerador y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos y de aquí se inoculó otro tubo con el mismo agar y se mantuvo en incubación por 24 horas a 32°C para activar la cepa. Después de las 24 horas de incubación, se inocularon otros 12 tubos con el mismo agar inclinado y se incubaron por 24 horas a 32°C. Posteriormente se preparó un complejo nutritivo (5 g bacto peptona, 3 g extracto de levadura, 5 ml glicerol, 750 ml agua salada, 250 ml de agua destilada, pH = 7.3) y se colocaron 300 ml de este complejo nutritivo en cada matraz de 500 ml, se esterilizaron en la autoclave, se dejaron enfriar y

se procedió a la inoculación de cada matraz con un tubo completo de la cepa incubada. A cada tubo con la cepa incubada por 24 horas se le agrega 5 ml de agua marina esterilizada, se homogeniza en el vortex para separar la cepa del agar para que la cepa quede en suspensión en el agua marina estéril. Vaciamos cada tubo con la cepa disuelta en un matraz con el complejo nutritivo preparado y estéril.

Finalmente se incubaron los matraces con la cepa inoculada durante 24 horas a 30°C en agitación 5.8 rpm, para poder incrementar la biomasa que fue colocada en los acuarios del desafío bacteriológico. Al término de este tiempo se extrajo una muestra de 2 ml de cada matraz y se leyó en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 600 nm y se comparo con la curva estándar realizada con anterioridad para determinar la concentración de la biomasa de *V. parahaemolyticus* en cada matraz (Fig. 1), y el volumen de cultivo necesario para obtener 500 millones de *Vibrio* por ml de agua en un acuario conteniendo 7 litros de agua marina (35×10^{11} UFC/ tanque)

Figura 1. Curva estándar *Vibrio parahaemolyticus*



7.5.4 Bacteriológico en hemolinfa

Se disolvió 88g del medio selectivo agar TCBS en 1litro de agua destilada, calentando para permitir su disolución. El medio se vació en cajas de Petri y se espero hasta su solidificación.

Las muestras de hemolinfa se tomaron del seno ventral vía la base del pleópodo del primer segmento abdominal, las horas de muestreo de hemolinfa fueron: 0.5, 1, 1.5 y 2 horas después de haber inoculado el *Vibrio parahaemolyticus* en los acuarios.

Se depositó 10 µl de hemolinfa sin anticoagulante por caja Petri con TCBS, para determinar la presencia de *Vibrio* en la hemolinfa y se incubaron de 24 a 48 horas a 29 °C.

7.6 Parámetros bioquímicos en hemolinfa

7.6.1 Toma de hemolinfa

Para poder tomar las muestras de hemolinfa, se preparó una solución con EDTA (SIC-EDTA) como anticoagulante (Vargas-Albores *et al.*, 1993) y se enfrió previamente a 4°C.

Se extrajo cuidadosamente de la región ventral del camarón entre el último par de pereiópodos y el primer par de pleópodos, un volumen de hemolinfa en relación a la cantidad de anticoagulante usada (1000 µl) la cual se colocó en los eppendorf siliconizados en hielo para prevenir activación y ruptura celular. Este tubo fue pesado al inicio con 1000µl de SIC y después de agregar la hemolinfa, y se sacó por diferencia la cantidad vertida al tubo, así como el factor de dilución. De este tubo posteriormente, se separó el paquete celular del plasma por centrifugación para realizar todos los parámetros bioquímicos.

En la hemolinfa completa se determinó la parte del examen bacteriológico y la cuantificación de hemocitos.

En el plasma se determinó la actividad de la FO, FO total (proFO + FO), concentración de proteína por un micrométodo adaptado de la técnica del Biuret, la concentración de BGBP por un ensayo de inhibición por ELISA en el CIAD en Hermosillo, Son.

En el paquete celular se determinó la actividad de la FO, FO total (proFO + FO). La concentración de proteína por un micrométodo adaptado de la técnica de protein-dye Binding (Bradford, 1976).

7.6.2 Cuenta total de hemocitos:

Se adicionaron 10 µl de hemolinfa colectada y diluida como se indica arriba a 90 µl de SIC-EDTA (Dilución 1 :10) previamente enfriados a 4°C. Se mezcló cuidadosamente en el vortex y se colocaron 10 µl de la mezcla en una cámara de Neubauer (hemacitómetro). Se dejó en reposo por 1 minuto y se contaron los hemocitos en un microscopio compuesto a 20X ó 40X.

Cálculos: Se multiplica el número promedio de hemocitos por cuadro, por 10⁴. Para obtener el número de células por ml de mezcla. El valor obtenido se multiplica por la dilución obtenida en el momento del sangrado (1:3 aprox.) y por la dilución posterior (1:10).

$$\text{Promedio} = \frac{C1 + C2 + C3 + C4}{4}$$

Sólo se contaron los cuatro cuadrantes externos. No se contaron los de en medio

7.6.3 BGBP en plasma

La BGBP se cuantificó por ELISA de competencia o inhibición donde el antígeno purificado es adsorbido a las placas y la muestra se agrega mezclada con una concentración conocida de anticuerpos. En este sistema el desarrollo de color es

inversamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra. Los ensayos de ELISA por competencia o inhibición tienen sensibilidad de 30 a 100 ng/ml⁻¹. Este análisis se desarrolló en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de Hermosillo, Son.

7. 6.4 Determinación de actividad Fenoloxidasa (FO)

Para determinar la actividad de fenoloxidasa se siguió el método para volúmenes pequeños de muestra utilizando microplacas (implementado por Hernández-López *et al.*, 1997). Se colocaron 50 µl de muestra en una microplaca, se adicionaron 50 µl de L-DOPA (3 mg/ml disuelta en agua destilada) y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente (25-28°C). Se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas.

Cálculos: Para determinar la actividad de FO ($\Delta\text{abs}/\text{min}/\text{mL}$) se dividió la absorbancia entre el tiempo de la reacción (10 minutos) y el volumen de hemolinfa correspondiente (tomando en cuenta la dilución de la muestra en la solución anticoagulante y en el reactivo).

Para la actividad específica el resultado de FO se divide entre la concentración de proteínas medida en el plasma por el método Biuret, o la concentración de proteínas de paquete celular medida por Bradford (expresada en mg/mL de hemolinfa).

7.6.5 Determinación del contenido de fenoloxidasa total (proFO+FO))

Se colocaron 50 µl de muestra en una microplaca y para asegurar la conversión total de la proFO a su forma activa (FO), se adicionaron 50 µl de tripsina de páncreas de

bovino (tipo IX: 0.1 mg/ml) disuelta en SIC. Se incubo a temperatura ambiente (25-28°C) y se dejo en reposo durante 3 minutos. Posteriormente se adicionaron 50 µl de L-DOPA (3 mg/ml disuelta en agua destilada) e incubó a temperatura ambiente (25-28°C). La absorbancia se leyó a 492 nm en un lector de placas.

Cálculos:

El cálculo de la actividad FOT se realizo con la misma metodología que para FO. Para determinar la cantidad de proFO, al valor de actividad obtenido en esta prueba se le resta el valor obtenido de actividad en la prueba de actividad FO.

Para determinar la actividad específica se dividió la actividad por mL de hemolinfa entre la concentración de proteínas (expresada en mg/mL de hemolinfa), obtenida por el método de Bradford (paquete celular) o Biuret (plasma).

7.6.6 Determinación de proteína (Bradford) para paquete celular

Micro método adaptado de la técnica de coomasie dye binding (Bradford, 1976) (CIAD) para contenido granular:

Se colocaron 10 µl de muestra en una microplaca. Se adicionaron 200 µl de reactivo de Bradford y se incubo durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 a 28°C) para posteriormente leer a una absorbancia de 595 nm.

7.6.7 Determinación de proteína (Biuret) para plasma

Micrométodo adaptado de la técnica del Biuret (CIAD):

Se colocaron 10 μ l de muestra en una microplaca. Se le adicionaron 200 μ l de reactivo de biuret y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 a 28°C), para posteriormente leer a una de absorbancia a 550 nm.

7.6.8 Determinación del colesterol en plasma

Micrométodo adaptado de la técnica propuesta en el kit comercial (CHOD-PAP.Merck:14394) recomendada en Hernández-López (1995):

Se colocaron 10 μ l de plasma en una microplaca. Se le adicionaron 200 μ l de solución reactiva para colesterol y se dejó incubar a temperatura ambiente (25-28°C) durante 10 minutos, para leer la absorbancia a 492 nm.

7.6.9 Determinación del Triglicéridos en plasma

Micrométodo adaptado de la técnica propuesta en el kit comercial (CHEMROY triglicéridos enzimático, método colorimétrico GPO):

Se colocan 10 μ l de muestra en una microplaca. Se le adicionan 200 μ l de reactivo de Biuret y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 a 28°C), para leer la absorbancia a 550 nm.

7.6.10 Determinación del Lípidos Totales en plasma

Micrométodo adaptado de la técnica propuesta en el kit comercial RANDOX:

Se colocaron 10 μ l de muestra en una microplaca. Se le adicionaron 200 μ l de reactivo de Biuret y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 a 28°C), para leer la absorbancia a 550 nm.

Las concentraciones de Bradford, Biuret, Lípidos Totales Triglicéridos y colesterol se determinaron realizando una curva con el estándar (Merck) diluido con el SIC y muestras de hemolinfa antes de calibrar el Multiskan.

7.7 Bioensayo de Supervivencia

Se realizó un bioensayo donde se analizó únicamente el tiempo de supervivencia del camarón azul *L. stylirostris* después de ser inoculado el acuario con un inculo de 36×10^{11} cfu de *V. parahaemolyticus*, previamente los animales fueron alimentados dos veces por día racionando al 5% de la biomasa de los tanques durante 14 días con las dietas experimentales 0% Pls, 1.5 % de PC y 3% de PC, en tanques de 500 L.

Se realizó un muestreo preliminar el cual permitió elegir los rangos de tallas del camarón para ser usados en el bioensayo. Las tallas utilizadas por tanque fueron: 0.5-1 g, 1-1.5 g, 1.5-2 g, 2-2.5 g, 2.5-3 g, 3-3.5 y 3.5-4.

Para el desafío bacteriológico, se distribuyeron los organismos alimentados con las dietas experimentales en acuarios pequeños (10 litros de capacidad) con una densidad de 3 camarones por acuario (2.5 g) y 7 replicados para cada uno de los tratamientos (21 acuarios en total para los acuarios desafiados) mientras que para los animales no desafiados se utilizaron 3 replicados (acuarios) para cada uno de los tratamientos (9

acuarios en total). No se hizo recambio de agua durante el desafío y la aireación se mantuvo constante.

7.8 Análisis Estadístico

En el presente experimento cada individuo fue considerado como una unidad muestral, teniéndose de 2 a 3 replicados por dieta, por tratamiento y por cada tiempo de muestreo.

Para el análisis de los parámetros de respuesta inmune, en un primer paso se realizó un análisis de varianza de una vía (entre dietas SPLS, PC y PC+) sobre los valores de muestras colectadas en todos los tiempos del muestreo.

En un segundo paso, se realizó un análisis de varianza de tres vías con los factores “PC” (en donde los tratamientos PC y PC+ se agruparon en uno solo, comparado con el tratamiento SPLS), “desafío” y “tiempo”, y se graficaron las cinéticas de respuesta inmune de cuatro grupos: SPLS no desafiados, SPLS desafiados, PC no desafiados, PC desafiados.

8. RESULTADOS

8.1 Dietas experimentales

La composición proximal de las dietas experimentales fue cercana a los valores teóricos esperados.

En la tabla V, se muestra la composición de las dietas experimentales.

Tabla V. Composición proximal de las dietas experimentales, estabilidad en el agua y contenido energético

ANALISIS	DIETA SPLS	DIETA 1.5% PC	DIETA 3% PC+
Materia seca	91.2	90.5	91.9
% de humedad	8.8	9.5	8.1
Proteína (%BH)	35.6	37.2	38.7
Lípidos (%BH)	10.9	11.1	11.3
Ceniza (%BH)	5.6	5.7	7.0
Fibra (%BH)	0.8	1.0	1.3
E.L.N (%BH)	38.3	35.5	33.6
% Pls (suplementado)	0	1.25	2.75
% Pls (esperado)	0.25	1.5	3.0
% Pls (analizado)	0.3	1.4	2.9
Lixiviación (%PMS)	10.3	10.2	10.5
Energía bruta (kcal/g)	4.2	4.1	4.2

%BH porcentaje de la base húmeda; % PMS pérdida de materia seca

Los análisis proximales de las dietas nos dieron resultados de proteína (35.58, 37.2 Y 38.72 %) y lípidos (10.94, 11.1 y 11.3) en rangos pequeños, lo cual nos llevó a considerar las dietas como isoproteicas e isolipídicas (4.1-4.2 kcal/g de energía bruta).

Para el cálculo de la energía (kcal/g) en las dietas los porcentajes de proteína, lípidos y carbohidratos se multiplicaron por los factores 5.6, 9.5 y 4.1 respectivamente, según Tacon (1989).

La prueba de lixiviación mostró un valor de pérdida de materia seca ligeramente superior a 10% para las tres dietas.

8.2 Estado sanitario de los organismos

Los resultados de los análisis de diagnóstico del virus de Taura practicados por la Universidad de Arizon dieron resultados negativos, descartando el principal riesgo infeccioso en el momento en que se colectaron los animales, indicando que los organismos utilizados en el presente experimento estaban en condiciones adecuadas de sanidad.

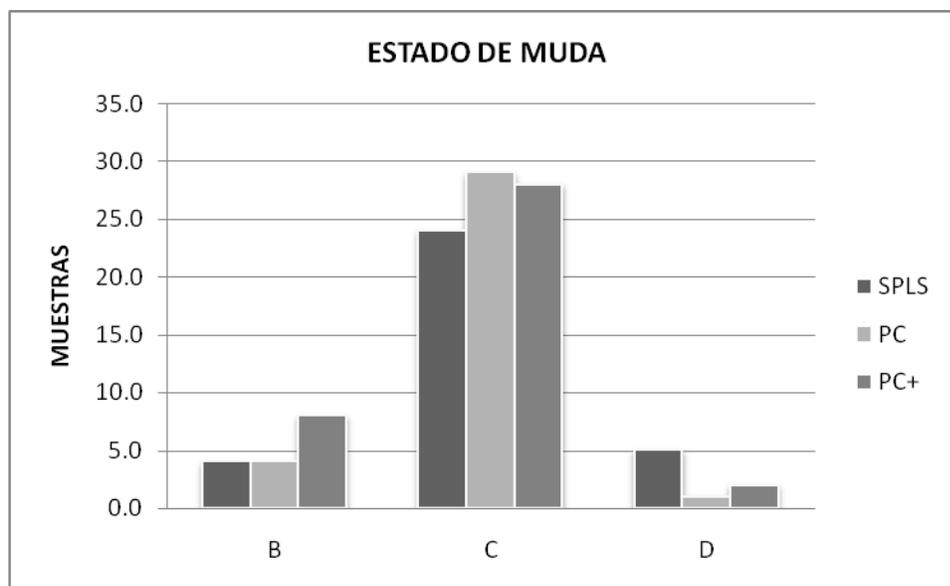
8.3 Estado de muda de los camarones experimentales.

En este experimento, el estado de muda más frecuente fue el C, para todas las dietas con 85.05% de los casos (Tabla VI), seguido por el estado denominado como B con un 16.8% y un mínimo de 8.4% de los animales presentaban estado D.

Tabla VI. Estado de muda de los camarones

ESTADIO DE MUDA	SPLS	PC	PC+	CASOS TOTALES %
B	4	4	8	16
C	24	29	28	81
D	5	1	2	8

Figura 2. Estados de muda de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.



8.4 Análisis de los parámetros de respuesta inmune

Los números de hemocitos y los parámetros bioquímicos promedio evaluados en plasma y paquete celular de los camarones alimentados con las dietas SPLS, PC y PC+ se muestran en la Tabla VII.

En esta tabla se dan los valores promedios obtenidos para los tratamientos, y el valor de significancia (Probabilidad) obtenido con análisis de variancia de una vía entre los tres tratamientos.

Tabla VII. Parámetros bioquímicos evaluados en plasma y paquete celular
Resultados promedios por dieta

Parámetro	Mean			Std. Deviación			PROB. ANOVA UNA VIA
	SPLS	PC	PC+	SPLS	PC	PC+	
Volumen de hemolinfa μL .	162	146	169	84	59	79	0.44
Hemocitos millones/mL	17	21	13	13	15	8	0.04
BGBP $\mu\text{g/mL}$	168	218	307	104	216	878	0.55
FO plasma	0.69	0.54	0.69	0.88	0.31	0.82	0.63
FO Total plasma	1.06	0.97	0.91	0.88	0.67	0.64	0.71
FO en FOT plasma	0.64	0.72	0.79	0.25	0.43	0.71	0.48
PFO plasma	0.37	0.42	0.22	0.45	0.41	0.56	0.19
Biuret en plasma	30	36	34	13	17	16	0.27
FO especifica	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.73
PFO especifica	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.53
FO paquete celular	0.07	0.13	0.07	0.06	0.32	0.06	0.30
FOT paquete celular	0.16	0.27	0.11	0.32	0.64	0.12	0.27
FO / FOT paquete	0.93	0.95	1.16	0.72	0.99	0.98	0.49
Casos de FO>FOT	0.36	0.31	0.47	0.49	0.47	0.51	0.39
PFO paquete	0.09	0.13	0.03	0.31	0.69	0.12	0.67
Bradford	1.13	0.89	1.83	4.35	3.01	4.32	0.58
FO especifica paquete	0.55	0.62	0.51	0.61	0.86	0.41	0.77
PFO especifica Paquete	0.34	0.78	0.20	0.92	3.58	0.80	0.51
Colesterol mg/dL	14.03	16.98	13.68	12.31	16.22	8.25	0.50
Triglicéridos mg/mL	0.18	0.19	0.15	0.15	0.17	0.10	0.55
Lípidos totales mg/mL	2.69	4.71	2.93	2.94	5.67	2.25	0.07

FO, FOT y PFO: actividades enzimáticas Fenol oxidasa, Fenol oxidasa Total y profenoloxidasas (Δ Absorbancia/mL/min).

En general no se observaron diferencias significativas entre dietas ($P > 0.05$) excepto para dos parámetros: el número de hemocitos por mL de hemolinfa ($P = 0.04$) y la concentración de lípidos totales por mililitro de plasma ($P = 0.07$, probabilidad ligeramente superior al límite de significancia).

En el análisis anterior (Tabla VII), las diferencias entre dietas pudieron haber sido enmascaradas por que se agruparon los valores de muestras provenientes de animales desafiados y no desafiados en los diferentes tiempos.

En el análisis siguiente se muestran las cinéticas de los parámetros bioquímicos mostrando por separado los grupos desafiados y no desafiados; para simplificar la interpretación se agruparon los tratamientos PC y PC+, quedando los siguientes grupos:

Sin Fosfolípidos no Desafiado	SPLSND
Sin Fosfolípidos Desafiado con <i>Vibrio</i>	SPLSD
Con Fosfolípidos no Desafiado	PCND
Con Fosfolípidos Desafiado con <i>Vibrio</i>	PCD

8.4.1 Hemocitos

En la figura 3 se muestra la cinética de número de hemocitos en el tiempo para los 4 tratamientos mencionados. Se observa una tendencia general al aumento para todos los tratamientos, después de una disminución durante las 24 horas de ayuno preliminar al desafío y a la alimentación de la hora cero.

Para mayor claridad en la figura se utilizó una escala en horas para mostrar el periodo de ayuno de tal manera que el punto de -24 horas sea visible y evitar el amontonamiento de los valores tomados a los 30, 90, 180 y 260 minutos.

El análisis de varianza factorial del número de hemocitos (Tabla VIII) confirma un efecto significativo de la hora del muestreo ($P < 0.00$ para el factor tiempo), mientras los factores dieta y desafío no tuvieron efectos significativos ($P = 0.94$ y $P = 0.32$ respectivamente). No se observa ninguna interacción significativa entre los factores ($P > 0.05$).

Las diferencias significativas detectadas por el ANOVA entre los tratamientos SPLS, PC y PC+ se pierden al promediar los valores de los tratamientos de PC y PC+.

Figura 3. Cinética de hemocitos en hemolinfa de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

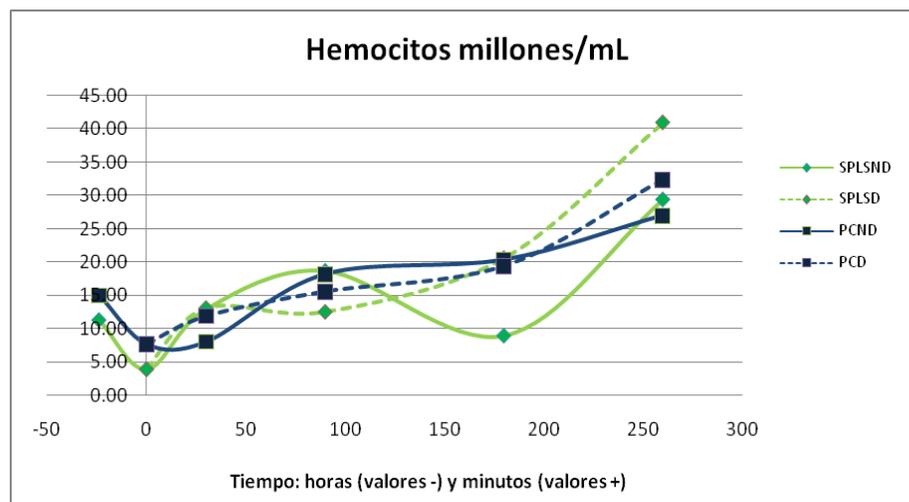


Tabla VIII. Análisis de varianza factorial del número de hemocitos - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo

Factor	Efectos principales			Interacciones			
	spls vs pc	desafio	tiempo	spls vs pc * desafio	spls vs pc * tiempo	desafio * tiempo	spls vs pc * desafio * tiempo
Hemocitos	0.94	0.32	0.00	0.62	0.86	0.40	0.72

8.4.2 BGBP

En la Figura 4 se muestra la cinética de concentración de BGBP. Los niveles séricos de BGBP parecen más elevados en los animales desafiados, esta impresión se confirma al graficar los valores promedios de BGBP, desafiados y no desafiados (fig. 5).

Sin embargo el análisis de varianza factorial no confirma un efecto significativo del desafío, sobre el nivel de BGBP ($P=0.28$) Tabla IX.

Figura 4. BGBP en hemolinfa de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

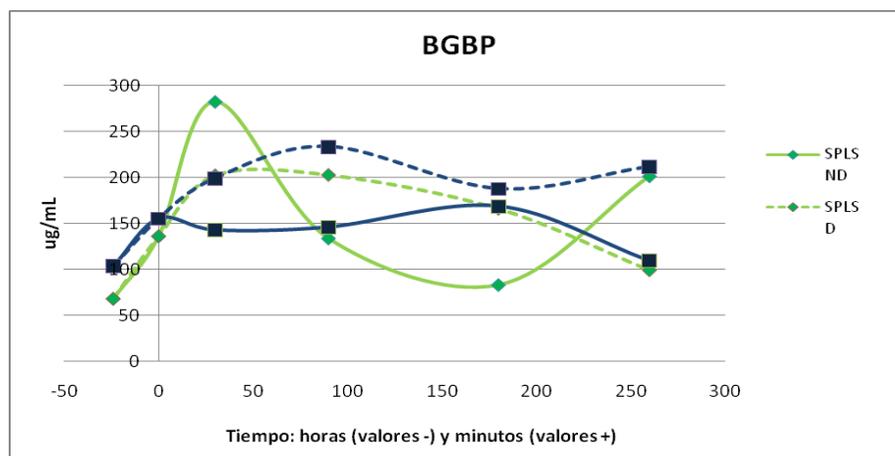
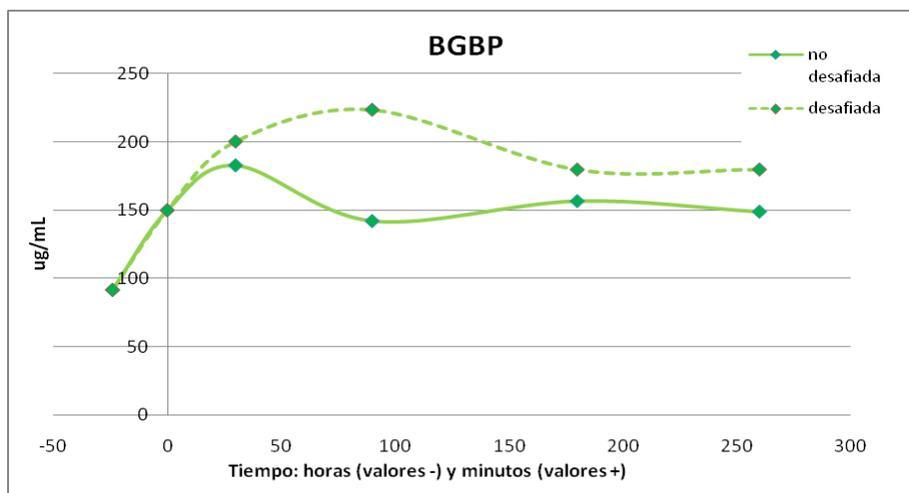


Tabla IX. Análisis de varianza factorial de BGBP - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo.

Factor	Efectos principales			Interacciones			
	spls vs pc	desafío	tiempo	spls vs pc * desafío	spls vs pc * tiempo	Desafío * tiempo	spls vs pc * desafío * tiempo
Probabilidad	0.48	0.28	0.32	0.17	0.55	0.53	0.35

Figura 5. BGBP en hemolinfa de camarones desafiados o no desafiados con *Vibrio*.



8.4.3. Actividad fenol oxidasa en plasma

Los resultados de actividad de FO y FOT en plasma así como de PFO (diferencia) y la relación de FO-en-FOT (FO/FOT) se dan en las figuras 6 a 9. Para mayor claridad en estas graficas se agruparon los dos tratamientos PC y PC+ bajo el nombre de PC en comparación con el tratamiento Sin Fosfolípidos (SPLS).

Un análisis de varianza factorial con los factores Dieta (SPLS vs PC), desafío (sí o no) y tiempo (-24 horas, 0, 30 min, 60 min, 90 min y 260 min) no permitió detectar efecto significativo para ninguno de los tres factores (Tabla X).

Se observan actividades FO y FOT aumentadas a los 90 minutos para el tratamiento SPLS no Desafiado, sin que se tenga una explicación de este fenómeno. En general los valores de FOT son mayores a los de FO lo que lleva a valores de PFO positivos de hasta $0.7 \Delta\text{abs}/\text{min}/\text{ml}$ (Fig. 8), mientras que la relación FO/FOT se ubicó alrededor de 0.6 a 0.8, sin variación clara con el tiempo (fig. 9).

En promedio (tabla VII) los valores en plasma fueron similares en los tratamientos, con promedios del orden de 0.5 a 0.7 $\Delta\text{abs}/\text{min}/\text{ml}$ para FO y de 0.2 a 0.4 $\Delta\text{abs}/\text{min}/\text{ml}$ para PFO.

Tabla X. Análisis de varianza factorial de actividad enol oxidasa en plasma- efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo.

Factor	Efectos principales			Interacciones			
	spls vs pc	desafío	tiempo	spls vs pc * desafío	spls vs pc * tiempo	desafío * tiempo	spls vs pc * desafío * tiempo
FO Plasma	0.966	0.777	0.666	0.250	0.072	0.110	0.201
FOT Plasma	0.770	0.373	0.505	0.461	0.146	0.402	0.407
PFO Plasma	0.62	0.35	0.65	0.57	0.56	0.71	0.22
FO en FOT Pl	0.35	0.95	0.94	0.55	0.79	0.96	0.57

Figura 6. Cinética de actividad Fenol oxidasa en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

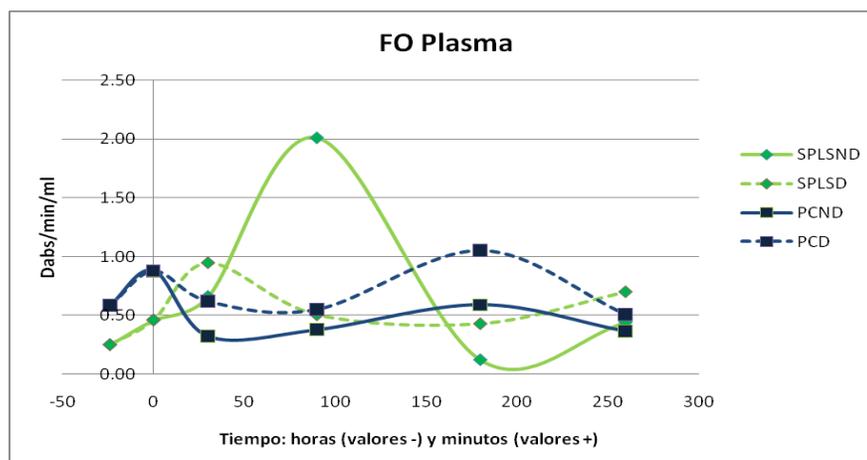


Figura 7. Cinética de actividad Fenol oxidasa total en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

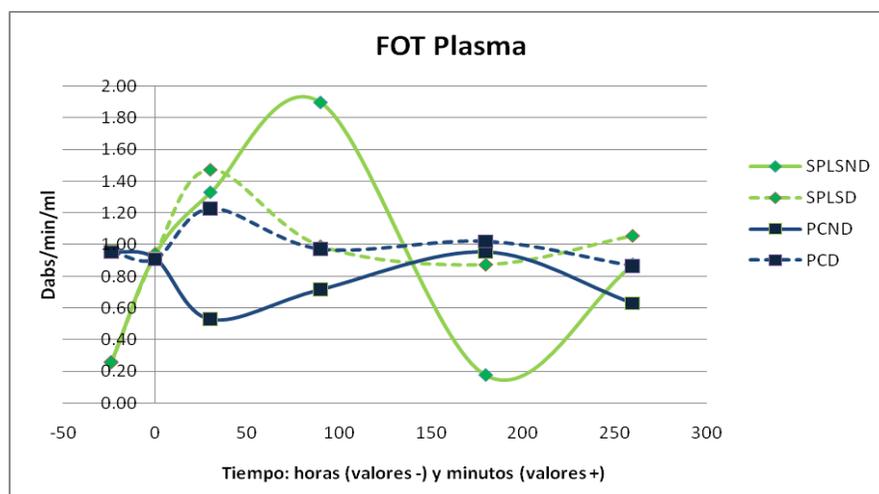


Figura 8. Cinética de pro-fenol oxidasa en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

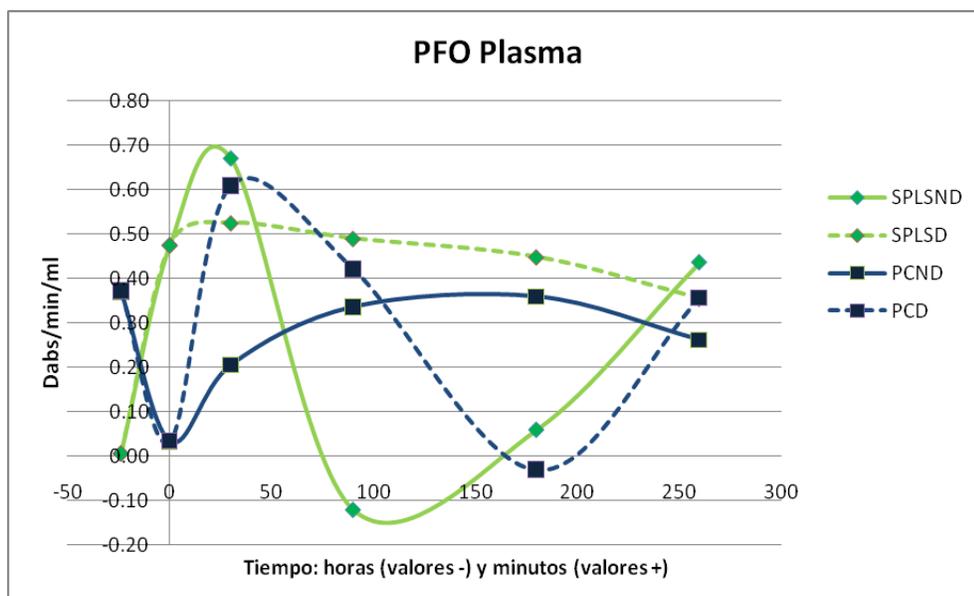
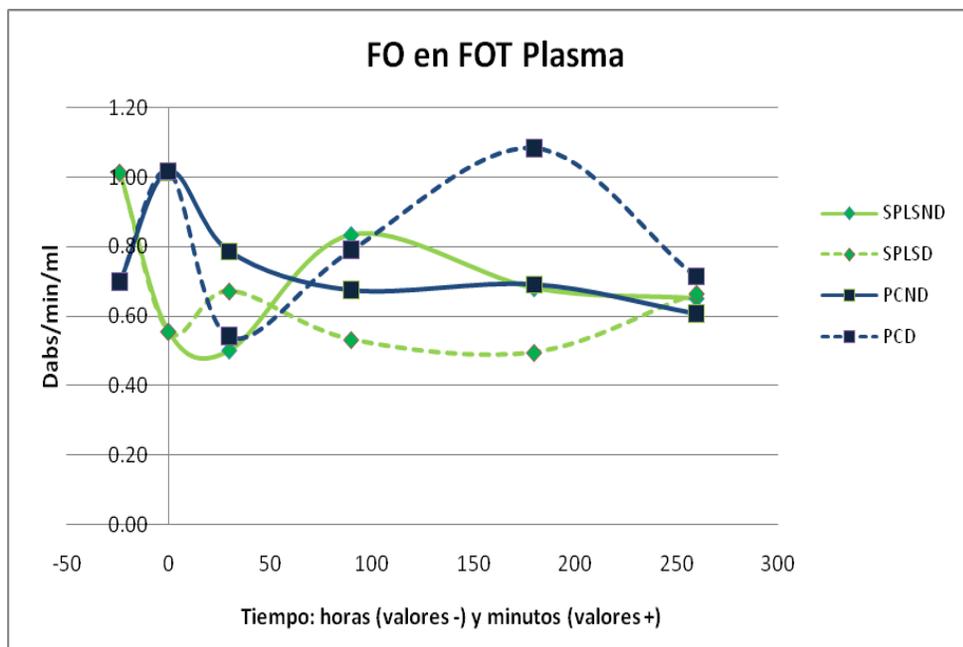


Figura 9. Cinética de FO/FOT en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.



Las actividades específicas de FO y FOT en plasma no presentaron diferencias significativas con el análisis de varianza trifactorial. Los valores promedios de FO y PFO fueron iguales para las tres dietas (Tabla V), en $0.02 \Delta\text{abs}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína para FO y $0.01\Delta\text{abs}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína para PFO.

8.4.4. Actividad fenol oxidasa en paquete celular

Los valores de actividad de FO en el paquete celular fueron del orden de 0.5 a $0.10 \Delta\text{abs}/\text{min}/\text{ml}$ y quedaron constantes en el tiempo excepto para los tratamientos PC no desafiados en los cuales la actividad aumenta a partir de 190 minutos.

Los valores de FOT fueron similares a los de FO y tuvieron un comportamiento similar hasta los 190 minutos con un aumento posterior para los tratamientos PC desafiado y también para SPLS desafiado.

Los valores de PFO fueron casi nulos durante la mayor parte del experimento (tiempo cero hasta 190 min), y divergen solo al tiempo 260 minutos.

La relación FO/FOT aumento para los tratamientos de PC desde el principio del experimento hasta los 30 min (con valores máximos de 1.6) y disminuye posteriormente en contraste para el tratamiento SPLS que se mantiene alrededor de 1-1.2 hasta los 90 min y disminuye posteriormente.

En la tabla XI podemos confirmar el efecto significativo del tiempo sobre los parámetros FOT, PFO y la relación de FO/FOT (P=0.00, P=0.07 y P=0.04 respectivamente). Esto corresponde a los valores altos de FOT y PFO observados a los 260 min (Fig. 11 y 12).

Los valores promedio de FO y PFO no fueron significativamente diferentes entre las dietas (Tabla VII).

Al comparar los valores FO y PFO en paquete celular contra los de plasma son menores (Tabla VII) tanto para FO como para PFO, la actividad total fue de 0.11 a 0.27 Δ abs/min/ml en el paquete celular mientras que en Plasma se encontró entre 0.9 y 1 Δ abs/min/ml.

Tabla XI. Análisis de varianza factorial de actividad fenol oxidasa en paquete celular - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo

Factor	Efectos principales			Interacciones			
	spls vs pc	Desafío	tiempo	spls vs pc * desafío	spls vs pc * tiempo	desafío * tiempo	spls vs pc * desafío * tiempo
FO Paquete	0.56	0.34	0.62	0.25	0.48	0.49	0.26
FOT Paquete	0.09	0.59	0.00	0.11	0.36	0.53	0.39
PFO Paquete	0.66	0.36	0.07	0.02	0.73	0.63	0.02
FO en FOT Pte	0.75	0.45	0.04	0.18	0.35	0.67	0.87

Figura 10. Cinética de fenol oxidasa en paquete celular de camarones alimentados con y sin Fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

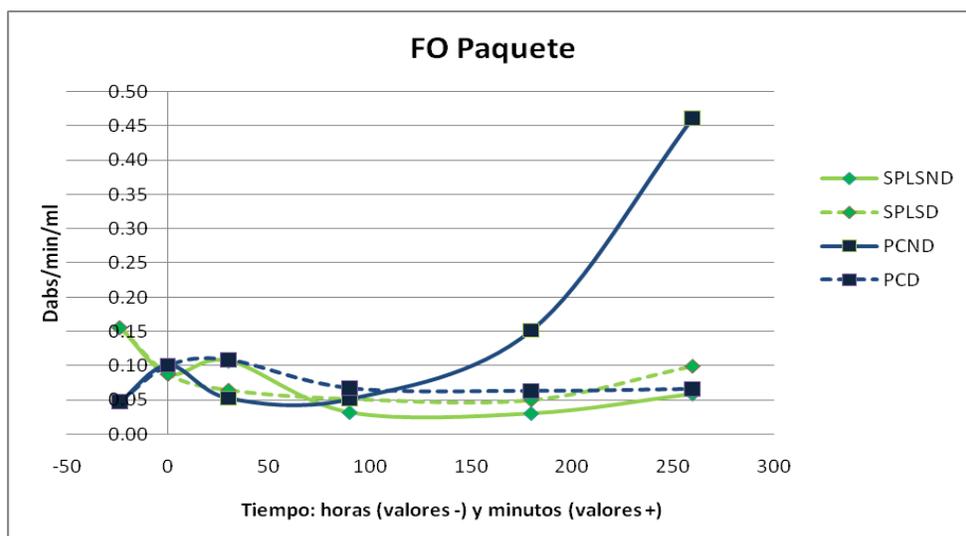


Figura 11. Cinética de fenol oxidasa total en paquete de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

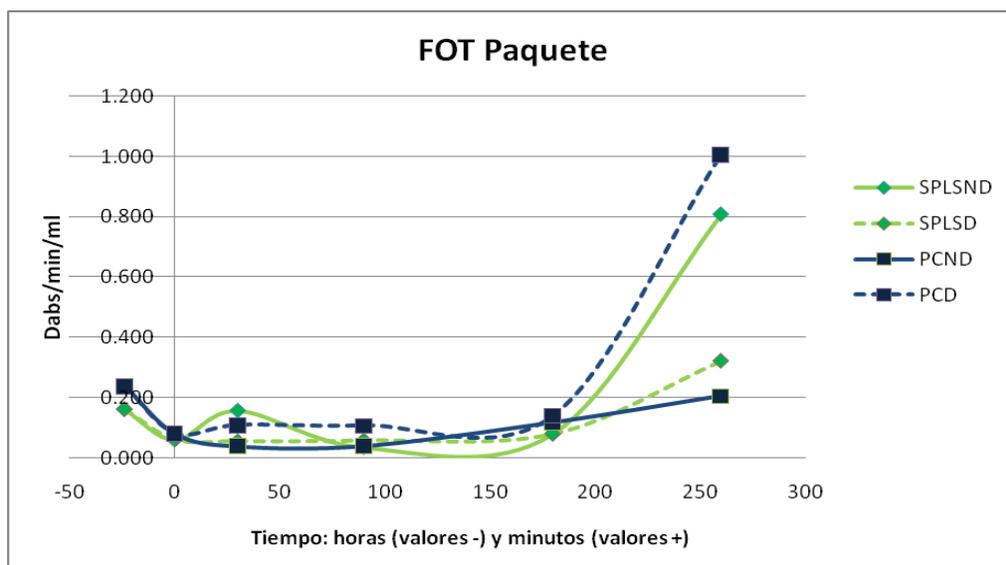


Figura 12. Cinética de pro-fenol oxidasa en paquete celular de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.

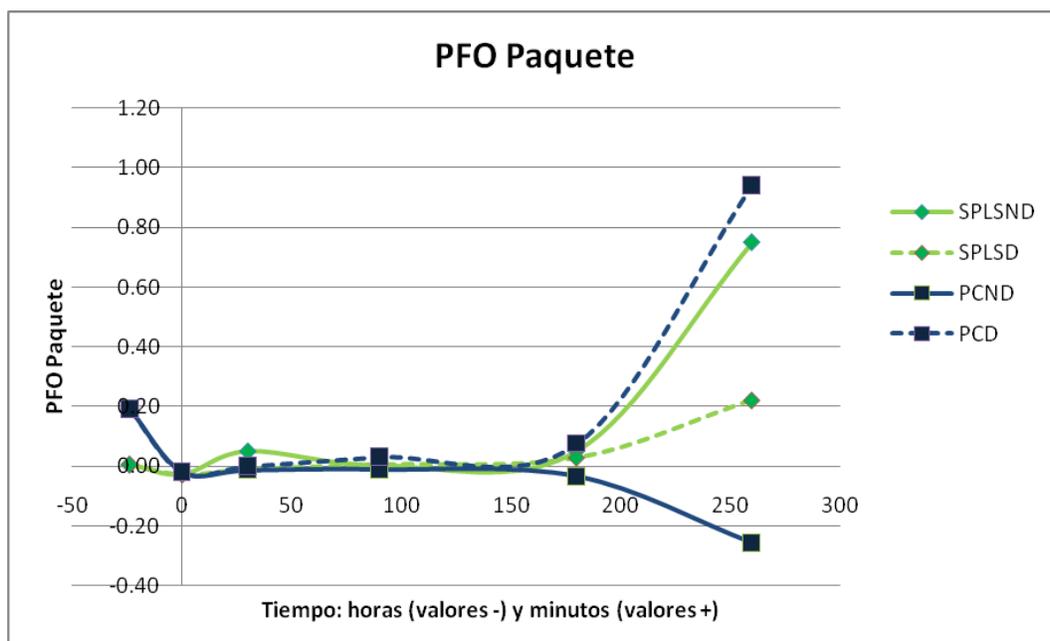
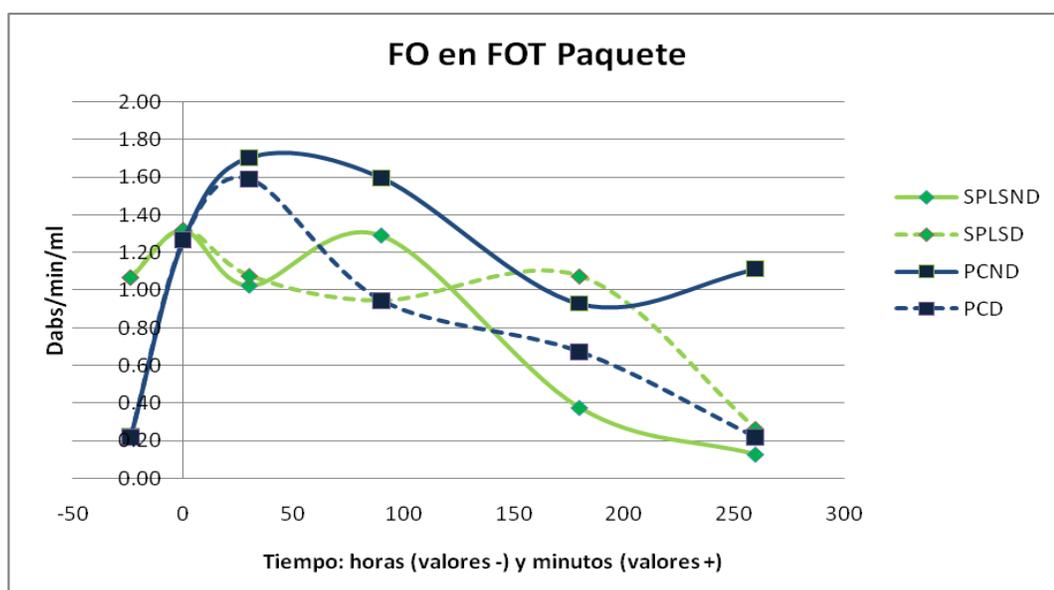


Figura 13. Cinética de FO/FOT en paquete celular de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.



Las actividades específicas de FO y FOT en paquete no presentaron diferencias significativas con el análisis de varianza trifactorial (dieta, desafío y tiempo). Los valores promedios de FO y PFO no fueron significativamente diferentes para las tres dietas (Tabla VII), con rangos de 0.51-0.62 Δ abs/min/mg de proteína para FO y 0.20-0.78 Δ abs/min/mg de proteína para PFO.

8.4.5. Colesterol en plasma

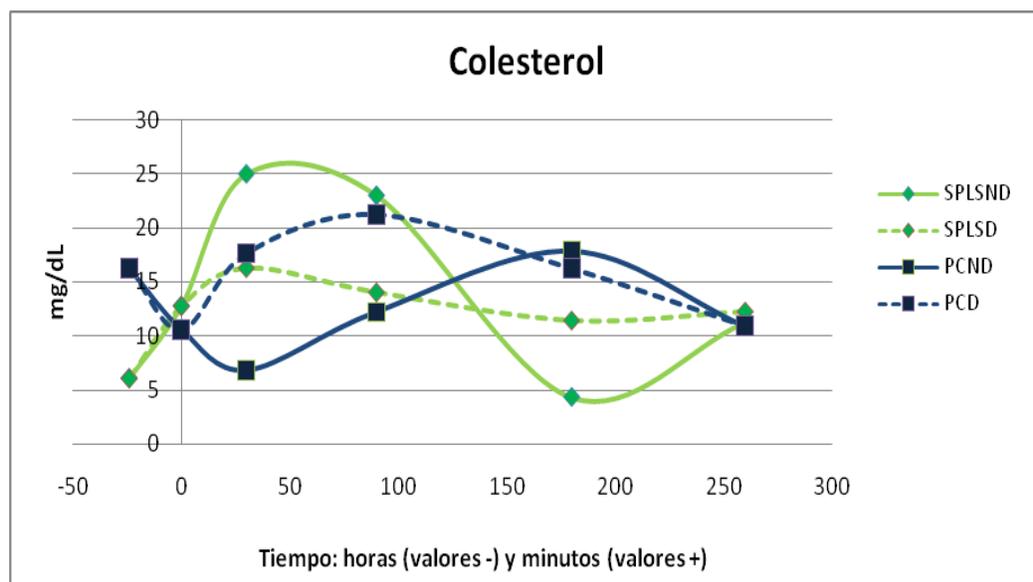
Los resultados obtenidos en los análisis de colesterol plasmático no presentan diferencias significativas entre las dietas (análisis de una vía ver tabla VII) y no se vieron afectados por los factores desafío y tiempo (Tabla XII).

Los valores promedio por tratamiento alimenticio estuvieron en el rango de 13.7 a 17 mg de colesterol /dL de plasma.

Tabla XII. Análisis de varianza factorial de colesterol en plasma - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo

Factor	Efectos principales			Interacciones			
	spls vs pc	desafio	tiempo	spls vs pc * desafio	spls vs pc * tiempo	Desafio * tiempo	spls vs pc * desafio * tiempo
Colesterol	0.66	0.75	0.70	0.31	0.38	0.99	0.39

Figura 14. Cinética de colesterol en hemolinfa de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.



8.4.6. Triglicéridos en plasma

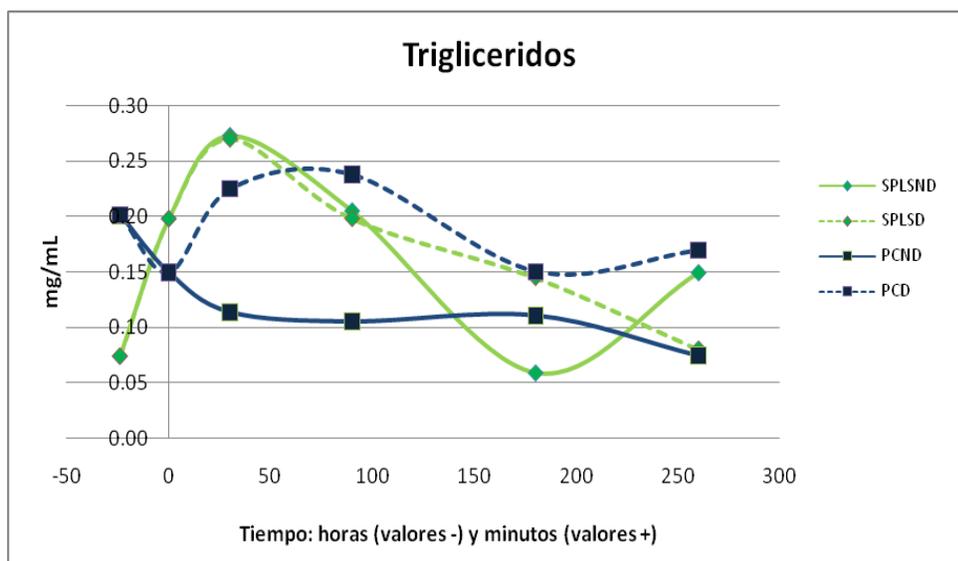
Los resultados obtenidos en los análisis de triglicéridos plasmático no presentan diferencias significativas entre las dietas (análisis de una vía ver tabla V) y no se vieron afectados por los factores desafío y tiempo (Tabla XIII).

Los valores promedio por tratamiento alimenticio estuvieron en el rango de 0.15 a 0.19 mg de triglicéridos /mL de plasma (Tabla VII)

Tabla XIII. Análisis de varianza factorial de triglicéridos en plasma - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo

Factor	Efectos principales			Interacciones			
	spls vs pc	desafío	tiempo	spls vs pc * desafío	spls vs pc * tiempo	desafío * tiempo	spls vs pc * desafío * tiempo
Triglicéridos	0.96	0.21	0.34	0.22	0.44	0.96	0.80

Figura 15. Triglicéridos en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.



8.4.7. Lípidos totales en plasma

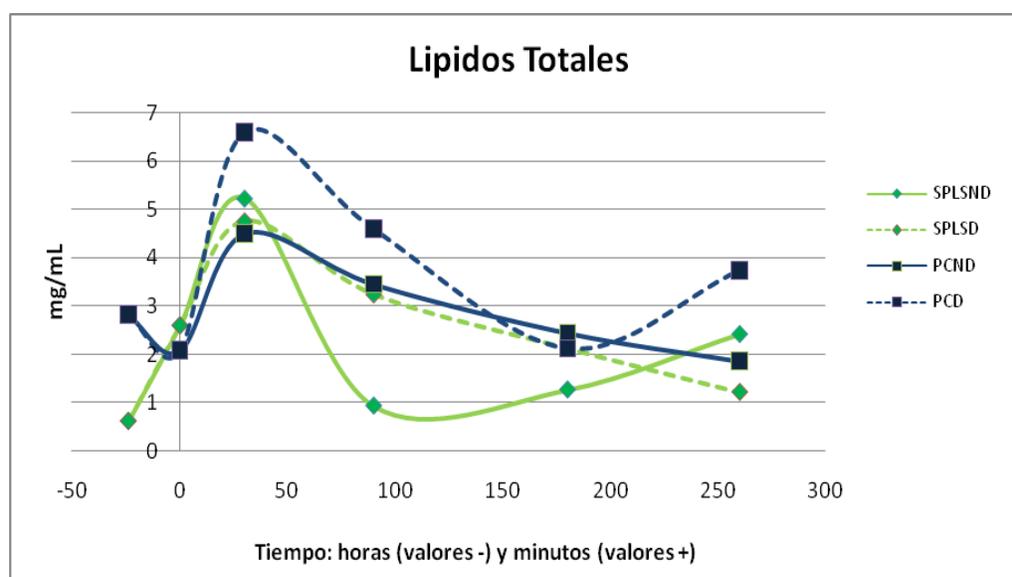
Los resultados obtenidos en los análisis de lípidos Totales plasmático presentan diferencias significativas entre las dietas (análisis de una vía ver tabla VII) con valor promedio alto para la dieta de PC (4.7 mg/mL) con respecto al valor promedio obtenido en los camarones alimentados sin Fosfolípidos (2.7 mg/mL). Sin embargo al realizar el análisis factorial, no se encontró efecto significativo de los factores dieta, desafío y tiempo (Tabla XIV).

Los valores promedio por tratamiento alimenticio estuvieron en el rango de 2.7 a 4.7 mg de lípidos totales /mL de plasma.

Tabla XIV. Análisis de varianza factorial de lípidos totales en plasma - efecto de los factores dieta, desafío bacteriano y tiempo

Factor	Efectos principales			Interacciones			
	spls vs pc	desafío	tiempo	spls vs pc * desafío	spls vs pc * tiempo	desafío * tiempo	spls vs pc * desafío * tiempo
Lípidos Totales	0.26	0.45	0.24	0.69	0.98	0.95	0.81

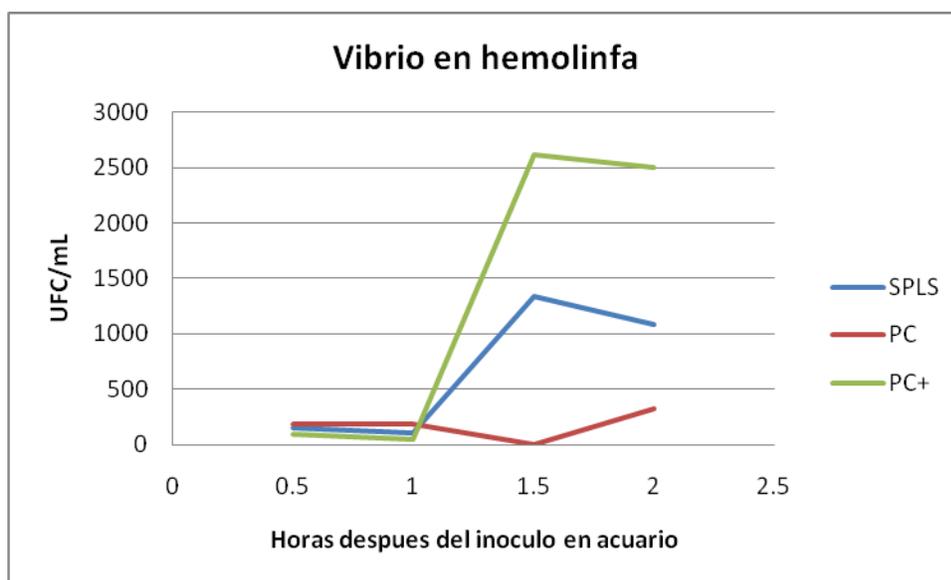
Figura 16. Lípidos totales en plasma de camarones alimentados con y sin fosfolípidos, desafiados o no desafiados con *Vibrio*.



8.5 Bacteriológico en hemolinfa

El número de bacterias en la hemolinfa se mantuvo en valores bajos durante la primera hora después de la inoculación de los acuarios pero presenta un incremento importante a la hora y media después del inoculo, excepto para los camarones alimentados con la dieta PC.

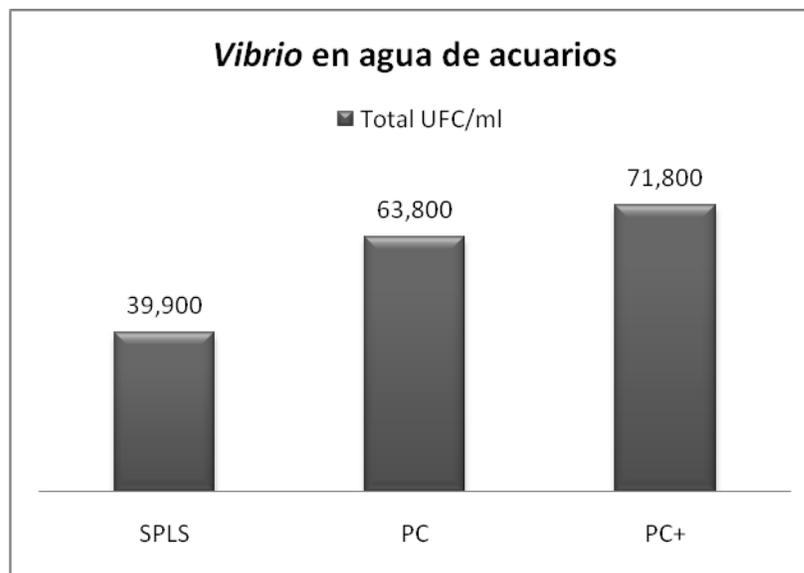
Figura 17. Unidades formadoras de colonias en hemolinfa de camarones desafiados.



8.6. Prueba de sobrevivencia.

Se registraron las unidades formadoras de colonias características de *V. parahaemolyticus* en el agua de los acuarios inmediatamente después de inocular. Los resultados promedios se dan en la Fig. 18.

Figura 18. Unidades formadoras de colonias en el agua de acuarios desafiados en el bioensayo para determinar sobrevivencia.

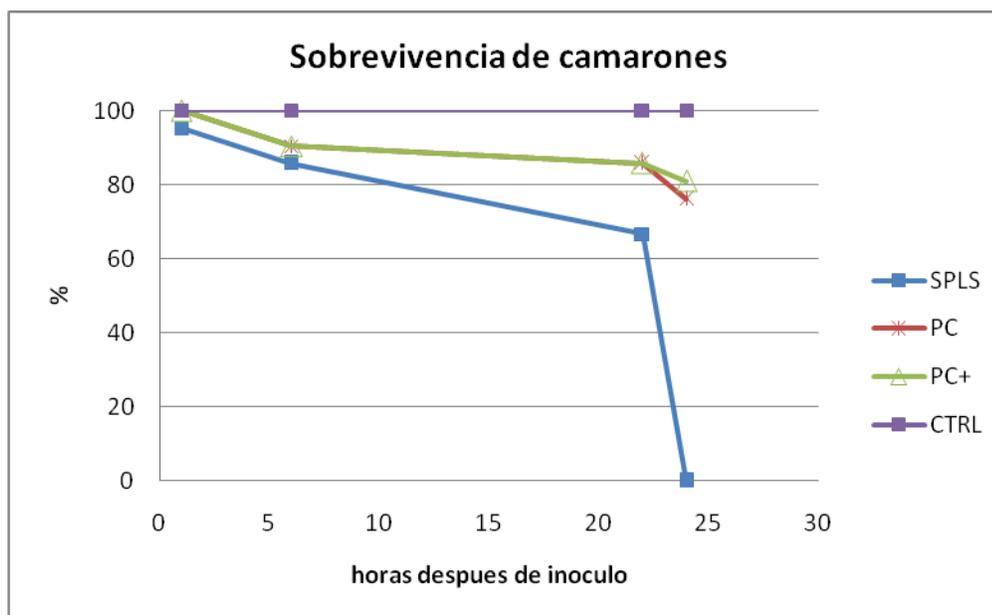


La mortalidad en los diferentes grupos solo ocurrió en las primeras 24 horas después del inoculo bacteriano. La mortalidad de los camarones alimentados con la dieta SPLS fue total en este periodo, mientras que para los animales alimentados con PC y PC+ solo alcanzo un 20 %. (Tabla XV fig. 19) El resto de los animales se encontraban todavía vivos 48 horas después, por lo que se dio por terminado el bioensayo por no contar ya con animales de dieta SPLS; los controles permanecieron vivos las 48 hrs del bioensayo.

Tabla XV. Mortalidad de camarones durante la prueba de sobrevivencia.

	HORA DE MUESTREO	SPLS	PC	PC+
Dia 1	12:20	1	0	0
	18:00	2	2	2
Dia 2	10:00	4	1	1
	12:00	14	2	1

Figura 19. Sobrevivencia de camarones después del inoculo bacteriano.



9. DISCUSIONES

9.1 Materias primas y dietas experimentales

La delipidación de la harina de pescado permitió la eliminar la principal fuente de fosfolípidos en las dietas experimentales y se aseguró una deficiencia de fosfolípidos en la dieta control.

Al formular las dietas experimentales cubriendo los otros requerimientos nutrimentales según Tacon (1987) y Akiyama *et al.*, (1989), y al constatar que las dietas fueron isoproteicas, isolipídicas e isoenergéticas (tabla V), se aseguró que los efectos nutricionales fueran debidos exclusivamente a la variación en los niveles dietarios de fosfolípidos.

9.2 Estado sanitario de los organismos

El estado sanitario de *L. stylirostris*, en ausencia del virus de Taura en los camarones utilizados en el presente experimento, permitió asegurar que la mortalidad observada en el bioensayo de sobrevivencia fuera causada principalmente por la exposición al agente infeccioso.

9.3 Estado de muda de los camarones

Más del 80% de los camarones muestreados se encontraron estado de muda C (Tabla VI, Figura 2), considerado como de reposo hormonal (Drach y Tchernigovtzeff,

1967), o de inter-muda, en el cual los animales tienen constantes la concentración de los diferentes metabolitos en la hemolinfa; por lo que los parámetros sanguíneos fueron influenciados principalmente por los tratamientos alimenticios y el desafío bacteriano.

9.4 Cuenta total de hemocitos

Se encontraron de 13 a 21 millones de hemocitos/mL de hemolinfa, cifras ligeramente diferentes a las reportadas por Hernández-López (2001), el cual reporta hasta 15 millones de hemocitos/mL en hemolinfa, y Treviño (2005), quien reporta 17 a 60 millones de hemocitos/mL de hemolinfa.

La diferencia en el número de hemocitos, que se observó en la tabla VII, entre dieta PC (valor alto) y la dieta PC+ (valor inferior al del control), podría ser debida a que el nivel dietario de 3% de PC tenga un efecto negativo, cuando se ha demostrado que el nivel óptimo es de 1% (Akiyama *et al.*, 1989). Esta es la segunda ocasión en donde se observa una disminución de números de hemocitos con una dieta suplementada con un 3% de fosfatidilcolina ya que Treviño (2005), reportó el mismo resultado con dietas SPLS, PC 1.25% y PC 3%.

Al conjuntar los tratamientos PC y PC+ en el análisis de varianza factorial (fig. 3 Tabla VIII), los valores promedios obtenidos con las dietas suplementadas con PC ya no se diferencian de la dieta control y solo se observó la disminución del número de hemocitos durante el periodo de ayuno y el aumento después de alimentar al tiempo cero, mientras que el desafío no tuvo efecto.

9.5 Concentración de BGBP en plasma

Las concentraciones de BGBP evaluadas en el presente trabajo fueron de 168 a 307 $\mu\text{g/mL}$ comparadas con los valores promedios globales en los bioensayos 1 y 2 de Treviño (2005), los cuales fueron de 581 $\mu\text{g/mL}$ (método Elisa tipo sándwich Castillo 1989) y 160 μg (método Elisa por inhibición CIAD).

Se confirma lo observado por Treviño (2005), de que el nivel dietario de fosfolípidos no influyó sobre la concentración plasmática de PC. La tendencia a un aumento de BGBP en animales desafiados, desafortunadamente no significativa estadísticamente, no se confirma en los resultados de Treviño (2005).

9.6 Actividad de fenol oxidasa en plasma

Los rangos de FO y FOT plasma son similares a los registrados en el bioensayo dos de Treviño (2005).

La presencia de PFO en el plasma podría indicar un fenómeno de degranulación reciente de los hemocitos de tal manera que se encuentra en el plasma enzima recién liberada y no activada.

9.7 Actividad FO paquete celular

En el paquete celular se esperaba una actividad FO prácticamente nula, con la casi totalidad de la enzima en forma inactiva (PFO). Por lo tanto se esperaba una relación FO/FOT muy baja entre 0 y 0.1 mientras se observó valores superiores a 1. En un principio el hecho de encontrar un valor de FO mayor al de FOT es poco probable ya

que el uso de tripsina en la determinación de FOT es para activar la enzima presente en forma no activa, de tal manera que siempre se espera un valor de FOT mayor al de FO.

La presencia de una actividad FO alta (superior a la actividad FOT) en el paquete celular, podría indicar que el paquete celular recuperado en este caso estaba constituido principalmente de restos de células recién degranuladas y desintegradas en lugar de células enteras. Al centrifugar una muestra de hemolinfa con numerosos hemocitos recientemente activados y en proceso de degranulación se puede imaginar que parte de la profenoloxidasa queda ligada a estructuras o a restos de estructuras celulares pero al mismo tiempo está en estado activado.

Este hecho parece congruente con un valor de FOT mucho mayor en el plasma que en el paquete celular ya que la mayor parte de la enzima habría sido liberada en el plasma a consecuencia de una degranulación masiva al momento de la extracción de la hemolinfa. La degranulación podría haber sido provocada por el contacto de los hemocitos con antígenos tisulares, contacto ocasionado por el desgarre de tejidos al momento de la punción con la jeringa en animales demasiados chicos, o cuando la punción no se realizó en el lugar preciso. Generalmente en esos casos el volumen de hemolinfa colectado es bajo, de tal manera que se observa un valor alto de la relación FO/FOT para las muestras de volumen inferior a 100 μ L, así como lo reporta Treviño (2005).

En este contexto (enzima fenol oxidasa activada en su totalidad a causa del manejo de la extracción) se puede considerar que una actividad FOT inferior a FO sería el resultado de una acción de lisis marginal de la tripsina sobre las moléculas de fenol oxidasa, resultando en una ligera disminución de su actividad.

9.8 Bacteriológico en hemolinfa

La incidencia mayor de *V. parahaemolyticus* en la hemolinfa de los camarones alimentados con la dieta PC + parece indicar que estos camarones fueron menos eficientes en la eliminación de vibrios que penetraron en el torrente sanguíneo al momento del desafío, con respecto a los camarones alimentados con la dieta PC. Este fenómeno también fue reportado por Treviño (2005) con *P. vannamei*.

En el presente trabajo el alto número de *Vibrio* no presenta relación con la mortalidad registrada la cual fue baja para las 2 dietas suplementadas con PC.

9.9 Bioensayo de Supervivencia

En este bioensayo se logro una mortalidad total en el grupo SPLS (100% en 24 hrs) probablemente debido a que se aumento drásticamente la dosis infecciosa, con una concentración esperada de 500 millones de vibrios / mL de agua en lugar de 2 millones / mL en el caso del bioensayo de supervivencia realizado por Treviño (2005).

Cabe señalar que no se registro mortalidad en los controles no infectados, lo que da validez al experimento.

En este contexto, los altos porcentajes de sobrevivencia observados para las dietas PC y PC+ (80%), y la ausencia total de mortalidad después de 24 hrs indican una marcada ventaja de la suplementación con PC lo cual no había sido demostrado en trabajos anteriores.

10. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó la respuesta de juveniles tempranos (peso inicial inferior a 0.7 g) de camarón azul sanos alimentados con una dieta control deficiente en fosfolípidos y dos dietas de misma composición, suplementadas con niveles de PC de 1.5 y 3%, frente a un desafío bacteriano realizado por la inoculación de una alta dosis de *V. parahaemolyticus*, suficiente para lograr una mortalidad del 100% en 24 hrs con la dieta control. La mayor parte de los organismos a los cuales se les extrajo hemolinfa se encontraban en estado de muda C.

Para casi todos los parámetros determinados en hemolinfa (concentración de plasmática de BGBP, actividad FO en plasma y hemocitos, concentración de colesterol y triglicéridos) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos alimenticios; sin embargo, la dieta PC, con un nivel de inclusión de 1.5% de fosfolípidos, tuvo mejor resultado que la dieta PC+ (3% de inclusión) y la SPLS (0% de fosfolípidos) obteniéndose un mayor número de hemocitos, una mayor concentración de lípidos totales en la hemolinfa y una mejor eficiencia en la eliminación de *Vibrio* de la hemolinfa.

Cuando se agrupan los tratamientos PC y PC+ el único parámetro que tiene una diferencia significativa contra el control (SPLS) es la concentración total de lípidos, mayor en camarones alimentados con PC.

Independientemente del nivel de suplementación con fosfolípidos, la concentración plasmática de BGBP fue ligeramente mayor en los animales sometidos a un desafío bacteriológico.

Aun cuando no se encontró diferencias muy marcadas en los parámetros de respuesta inmune, los resultados del bioensayo de sobrevivencia fueron contundentes y claramente a favor de ambas dietas suplementadas con PC, con una sobrevivencia del 80%.

LITERATURA CONSULTADA

Akiyama, D. M. y N.L. M. Chwang 1989. Requerimientos alimenticios del camarón y manejo del alimento. Proceedings of the southeast Asia Shrimp Farm Management Workshop. Phillipines, Indonesia, Thailand. Julio 26-agosto 11.

A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist 942.05. 15th Ed. Kenneth Helrich Ed. Arlington, Virginia, USA. Pp 1298.

Aquacop, 1978. Study on nutritional requirements and growth of *Penaeus merguensis* in tanks by means of purified and artificial diets. Proc. World Maricult. Soc. Ann.Meet. Vol. 9,225-234.

Baticados, M.C.L., Lavilla Pitogo C.R. Cruz-Lacierda E.R., De La pena L.D y Sunaz 1990. Studies and the chemical control and luminous bacterial *Vibrio Harvey* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larve and rearing water. Diseased of Aquatic organisms 9:133-139.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**, pp248-254.

Brock, J.A. 1992. Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp. Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. Proceedings of a Workshop in Honolulu, Hawaii.

Brock, J.A and Main K.L. 1994. A Guide to the common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 242 pp.

Castillo, C. I. C. 1999. Implementación de un método inmunoenzimático para la determinación de la proteína que reconoce β -glucanos del plasma de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis profesional Químico Biólogo. Universidad de Sonora.

Cheng, W., Chun-Hung, L., Su-Tuen, Y., Jiann-Chu, C., 2005. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1,3 glucan binding protein (LGBP) from white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish & shellfish immunology 18: 297-310

Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque, P. Domínguez. D. Re-Araujo and R. Mendoza-Alfaro. 1996. Effect of dietary lecithin on *Penaeus vannamei* performance. Asociación Americana de Soya.

D'Abramo, L.R. 1997. Triacylglycerols and Fatty acids. Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture. Vol. 6 editors Louis r. D'Abramo Douglas; E. Conklin and Dean M. Akiyama. World Aquaculture Society.

Drach, P., Tchernigovtzeff, C. 1967. Sur le method de determination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie milieu*, 18(3^a): 595-610.

Dominguez P. 1995. Valor Nutricional de la lecitina de soya en el camarón *Penaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura en Biología UANL.

Hernández-López, J. ; and F. Vargas-Albores. 1995. Quantification of pathogenic marine *Vibrio* using membrane filter technique. *Journal of Microbiological Methods* 21, 143-149.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. and F. Vargas-Albores. 1997. Micromethods for quantifying immune components of shrimp

Johansson and Söderhall K. K. 1992. Cellular defense and cell adhesion in crustaceans. *Anim. Bio.* 1:97-107.

Lavilla Pitogo, C.R., baticados, M.C.L Cruz Lacierda , E.R y de la Pena L.D. 1990. Ocurrance of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larve in the Philippines. *Aquaculture* 91:1-14.

Lightner, D.V. 1996. A Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. The world Aquaculture society. Baton Rouge, LA, USA.

Monhey, L.L., Lightner D. V. y Bell T.A 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea :Decapoda). *J. world aquaculture society* 25:116-125.

Ratcliffe et al 1991. Activation of the prophenoloxidase cascade and iniation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. Vol. 15 pp. 33-39

Söderhall K, 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods? A review. *Develop. Comp. Immunol.* 6 601-611.

Söderhall K., Smith and Johansson. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans evidence for cellular co-operation in the defense reactions of arthropods. *Cell Tissue Res* 245:43-49.

Söderhall K. K. 1989. Cellular Immunity in Crustaceans and the proPo sistem. Vol.5, No. 6.

Tacon, A.G.J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp, a training manual. 1.- The essential nutrients; F.A.O. 117 pp.

Teshima, S., A. Kanazawa, and Y. Kakuta, 1986. Effects of dietary phospholipids on lipid transport in the juvenile prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52(1), 159-163.

Treviño Carrillo L.M. 2005. Efecto de los fosfolípidos dietarios sobre la eficiencia de la respuesta inmune en camarones peneidos. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Facultad de ciencias biológicas. UANL. 115 pp.

Vargas-Albores F., Guzmán, M.A. and Ochoa, J.L.. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303.

Vargas-Albores F., Gollas Galván, 1996. Activation of the Prophenoloxidase system of the Brown-Shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 113C (1): 61-66.

Vargas-Albores F., Jiménez-Vega, F., and Söderhäll, K., 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 20 (5): 299-306.

Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., y Yepiz-Plascencia, G. 1997. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 116B (4), 453-458.

Vargas-Albores F., and Yepiz-Plascencia, G. 1998. Shrimp immunity. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 5, 197-210.

Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13-21.

APENDICE 1

EVIDENCIA DE PUBLICACION: RESUMEN DEL POSTER PRESENTADO EN EL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICION ACUICOLA, 19-22 DE NOVIEMBRE 2000, MERIDA YUCATAN. PUBLICADO EN EL LIBRO DE PROGRAMA Y RESUMENES.

EVALUACION DE LOS FOSFOLÍPIDOS DIETARIOS SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE *Penaeus stylirostris* INFECTADOS CON *Vibrio parahaemolyticus*

Sandra de la Cruz Hernández ^{1*}, L. Elizabeth Cruz-Suárez ¹, Denis Ricque-Marie ¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Fac. de Ciencias Biológicas, Programa Maricultura, Apdo. Postal F-56, San Nicolás de los Garza, NL 66450, México. Fax (52) 8352 6380
E-mail: edit100@hotmail.com.; elicruz@hotmail.com

Palabras clave: *respuesta inmune, desafío bacteriológico, Vibrio parahaemolyticus.*

Introducción. En camarones la defensa del hospedero ante la invasión del microorganismo oportunista es efectuada principalmente por la fagocitosis, encapsulación y actividad de aglutinación de los hemocitos circulantes. El reconocimiento y la actividad celular en estos animales puede ser mediada por la actividad del sistema profenol oxidasa (ProPO) de la hemolinfa. Algunas proteínas plasmáticas, como es el caso de la BGBP (por sus siglas en inglés BetaA Glucan Binding Protein), que reconoce los beta glucanos de la pared celular de agentes infecciosos, provocan la liberación de ProPo por los hemocitos, iniciando los mecanismos de la respuesta hemocítica (1). Los hemocitos estimulados liberan el contenido granular (degranulación) y la proPO es convertida en enzima denominada fenoloxidasas por intervención de proteinasa llamada enzima activadora de la proPO. La fenoloxidasas aumenta la actividad fagocítica y fortalece el sistema de defensa. Al estimular otras actividades, la respuesta se magnifica y contribuye a la eliminación del parásito o sustancia extraña.

El objetivo de este trabajo fue aumentar la concentración de estas moléculas plasmáticas a través de la inclusión de fosfolípidos dietarios que funcionarían como precursores, esperando con ello aumentar la velocidad y capacidad de respuesta del sistema inmunológico del camarón contra agentes bacterianos infecciosos (*Vibrio parahaemolyticus*), a través de bioensayos nutricionales y exposición de los camarones a este agente bacteriano.

Metodología. Se suministraron 3 dietas experimentales (sin PC, con 1.25% y 3% de PC) a camarones *L. stylirostris* de 5 a 7 gramos durante catorce días a una tasa de alimentación del 5% diario. Posteriormente, los 3 grupos de camarones fueron sometidos al desafío por inoculación: control negativo y desafío con *Vibrio parahaemolyticus* con su caldo. Para ello se utilizaron 3 camarones por acuario con 3

repeticiones por tratamiento y 6 tiempos de muestreo postprandiales. Para cada camarón se midió en la hemolinfa (plasma y paquete celular) la actividad fenol-oxidasa (FO) y la actividad fenol-oxidasa total (FOTOT) obtenida por activación de la profenol-oxidasa (ProFO) gracias a la incubación de la hemolinfa con tripsina (ProFO = FOTOT-FO), y las concentraciones de proteína y BGBP.

Resultados y Discusión. El factor dieta no arroja diferencias significativas. Con respecto a la hora de muestreo la ProFO paquete disminuyó después de 24 h de ayuno (P=0.00), con o sin desafío. La BGBP aumentó temporalmente durante la cinética de muestreo (P=0.000), solo en los animales desafiados (P=0.013).

Tabla 1 Probabilidades arrojadas por el análisis de varianza factorial.

Parámetro	Efecto de la Dieta	Efecto de la hora de muestreo	Efecto del desafío
Hemocitos	.9013	.0001	.3917
ProFO plasma	.4001	.8851	..5277
ProFO paquete	.4117	.000	.4332
ProFO esp. paquete	.1735	.000	.6549
FO plasma	.5663	.7138	.7605
FO esp. plasma	.2268	.5325	.1409
FO paquete	.1002	.1688	.7875
BGBP plasma	.2593	.000	.0130

Conclusiones. Aunque se observó una reacción al desafío, no se pudo comprobar el efecto de los fosfolípidos dietarios sobre esta respuesta. Se recomienda suplementar la dieta con fosfolípidos durante un periodo más largo antes de exponer los animales al desafío así como también alargar el periodo de muestreo.

Bibliografía.

1.- Vargas-Albores, F. y Yepiz-Plascencia, G. (2000) Beta Glucan Protein (BGBP) and its Role in Shrimp Immune Response. *Aquaculture*. 191: 13-21.