

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**ESTRÉS OXIDATIVO EN CAMARON BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*) EN RESPUESTA A HIPOXIA Y  
REOXIGENACIÓN.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA:

ECÓLOGO MARINO: MAURICIO AHUEJOTE SANDOVAL.



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**  
**ACTA DE REVISION DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 26 del mes de abril del 2004 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“ESTRÉS OXIDATIVO EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*) EN RESPUESTA A HIPOXIA Y REOXIGENACIÓN”**

Presentada por el alumno:

**AHUEJOTE**  
Apellido paterno

**SANDOVAL**  
materno

**MAURICIO**  
nombre(s)

Con registro: 

B	0	1	1	2	7	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

DRA. TANIA ZENTENO SAVIN

PRESIDENTE

DRA. SILVIE DUMAS LEPAGE

SECRETARIO

MC. RICARDO SALDIERNA MARTINEZ  
CO-DIRECTOR

SEGUNDO VOCAL

MC. SERGIO MARTINEZ DIAZ

TERCER VOCAL

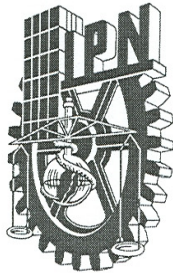
DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VAZQUEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. FRANCISCO ARREGUIN SANCHEZ



I. P. N.  
CICIMAR  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 26 del mes Abril del año 2004, el (la) que suscribe MAURICIO AHUEJOTE SANDOVAL alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B011279 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DRA. TANIA ZENTENO SAVÍN y cede los derechos del trabajo titulado: “ESTRÉS OXIDATIVO EN CAMARON BLANCO ( *Litopenaeus vannamei* ) EN RESPUESTA A HIPOXIA Y REOXIGENACIÓN” al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: mahuejotes@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**MAURICIO AHUEJOTE SANDOVAL**

*nombre y firma*

## DEDICATORIA

A mis padres **Marcelina** y **Teodoro** por haberme enseñado a que si quiero algo tengo que esforzarme para poder lógralo.

A mi Abuelita **María (Lidia)** por haberme acompañado durante mi primer año en La Paz.

A mi Hermano **Moisés** que fue la persona que hizo posible el poder lograr este eslabón educativo, así como también a todo mis demás hermanos.

A mi compañera **Carmen** quien ha estado conmigo en los momentos buenos y difíciles que hemos compartido juntos. Así también por dedicarme mucho de su tiempo.

Gracias

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (IPN-CICIMAR) por haberme aceptado en su postgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo prestado a través de la beca crédito número 165150.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN por el apoyo otorgado durante la estancia en el proyecto: RESPUESTA DEL PLANCTON AL FORZAMIENTO FÍSICO DE MESOESCALA EN EL ECOSISTEMA PELÁGICO DE LA ZONA SUR DE LA CORRIENTE DE CALIFORNIA (2001-2005). CGPI 20020378, 20031234 y 20040035.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por facilitarme el uso de las instalaciones para el desarrollo de la investigación realizada en este estudio.

A los proyectos SEP-CONACYT 4058-Q (2003-2006), SIMAC 990107501, IFS A/2968-1 y al proyecto interno del CIBNOR: ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPECIES DE ACUACULTIVO por el apoyo financiero para realizar este trabajo.

Al departamento de Plancton y Ecología Marina de CICIMAR por hacer uso de las instalaciones durante mi estancia.

Un Agradecimiento especial a mi directora de tesis Dra. Tania Zenteno Savín por tener mucha paciencia, tiempo (en el desarrollo del trabajo de tesis) y por haberme brindado su amistad. Al M. en C. Ricardo Saldierna Martínez por su paciencia durante mi estancia y desarrollo del trabajo de tesis.

Al comité revisor de tesis M. en C. Sergio Martínez Díaz, quien estuvo pendiente del desarrollo del trabajo desde el inicio, así también por los comentarios realizados en el manejo de los datos obtenidos en el trabajo, y a las Dras. Silvie Dumas y Patricia Cevallos por las observaciones, comentarios y sugerencias hechas en el manuscrito.

El desarrollo de esta investigación fue posible gracias al apoyo de muchas personas. Agradezco en especial a los técnicos encargados de la estanquería litoral del CIBNOR (Chuy,

Colado, etc.), del laboratorio de nutrición acuícola del CIBNOR (Sandra) y del laboratorio de cuarentena del CIBNOR (Alejandra) por el apoyo recibido durante el traslado y mantenimiento de los camarones.

Gracias al grupo de estrés oxidativo: Tania, Juan Larrinaga, Juan Carlos, Estrellita, Paloma, Mariana y Lalo, Joe, Norma, Katina, Jorge del Angel, Beto y Pedro; gracias por hacer agradable la estancia en el laboratorio.

Así también un agradecimiento en especial a mi primo Chiquis y a Doña Martha, a Lupillo y doña Guille, Al Parna y doña Lala y a todas las persona que de una u otra manera estuvieron presentes durante el tiempo que duro mi estancia en este lugar.

Agradezco a Carmen Díaz, la paciencia, el cariño y el tiempo que ha compartido conmigo desde que la conocí.

# INDICE

Página

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iii
INDICE DE ANEXOS.....	iv
GLOSARIO.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	6
JUSTIFICACION.....	11
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y METODOS.....	13
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Distintas marcas de urópodos de camarón para identificar organismos. ....	14
Figura 2.- Primera etapa experimental. Exposición a hipoxia por 6, 12 y 24 horas e hipoxia 6, 12 y 24 horas más 1 hora de reoxigenación.....	16
Figura 3.- Segunda etapa experimental. Exposición a 24 horas de hipoxia más 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de reoxigenación.....	18
Figura 4 .- Metabolismo oxidativo en los tejidos de camarón blanco bajo condiciones control. Primera fase experimental: exposición a hipoxia.....	23
Figura 5 Niveles de metabolitos en músculo de camarón blanco expuesto a hipoxia durante 6, 12 y 24 horas más 1 hora de reoxigenación. A) lactato total, B) radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante.....	25
Figura 6.- Niveles de metabolitos en branquias de camarón blanco expuesto a hipoxia durante 6, 12 y 24 horas más 1 hora de reoxigenación. A) lactato total, B) radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total.....	26
Figura 7.- Niveles de metabolitos en hepatopáncreas de camarón blanco expuesto a hipoxia durante 6, 12 y 24 horas más 1 hora de reoxigenación. A) lactato total, B) radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante. total.....	27
Figura 8.- Metabolismo oxidativo en los tejidos de camarón blanco bajo condiciones control. Segunda fase experimental: exposición a reoxigenación.....	28
Figura 9.- Niveles de metabolitos en músculo de camarón blanco, expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. A) lactato total, B) radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total.....	30
Figura 10.- Niveles de metabolitos en branquias de camarón blanco, expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. A) lactato total, B) radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total.....	32



Figura 11.- Niveles de metabolitos en branquias de camarón blanco, expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. A) lactato total, B) radical superóxido ( $O_2^-$ ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total.....34

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en tejidos de camarón blanco mantenidos bajo condiciones control; en la primera fase experimental.....	58
Tabla 2. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en músculo de camarón blanco mantenidos en la primera etapa experimental. ....	59
Tabla 3. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en branquias de camarón blanco mantenidos en la primera etapa experimental. ....	60
Tabla 4. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en hepatopáncreas de camarón blanco mantenidos en la primera etapa experimental. ....	61
Tabla 5. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en tejidos de camarón blanco mantenidos bajo condiciones control, en la segunda fase experimental. ....	62
Tabla 6. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en músculo de camarón blanco mantenidos en la segunda etapa experimental. ....	63
Tabla 7. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en branquias de camarón blanco mantenidos en la segunda etapa experimental. ....	65
Tabla 8. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en hepatopáncreas de camarón blanco en la segunda etapa experimental. ....	66

## INDICE DE ANEXOS

### I.- Análisis de varianza de la primera fase experimental: Exposición a hipoxia.

Músculo.....	66
Branquias.....	67
Hepatopáncreas.....	68

### II.- Análisis de varianza de la segunda fase experimental: Exposición a reoxigenación.

Músculo.....	69
Branquias.....	70
Hepatopancreas.....	72

IIIa.- Niveles de lactato total, producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuestos en la primera fase experimental.....74

IIIb.- Niveles de lactato total, producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuestos en la segunda fase experimental.....75

## GLOSARIO

**$\alpha$  tocoferol:** Es la forma más común de vitamina E, es un antioxidante liposoluble y uno de los principales protectores de las membranas celulares y lipoproteínas contra la acción de los radicales libres.

**Antioxidante:** Cualquier sustancia que estando en concentración mucho más baja que la de cualquier sustrato oxidable por un radical libre, previene o demora la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante posee una estructura química apropiada para reaccionar fácilmente con un radical libre con un costo mínimo para el organismo

**Anoxia:** Falta de oxígeno.

**$\beta$  caroteno:** Es una de las sustancias más activas de la familia de los carotenoides. Participa como precursor en la síntesis de vitamina A o retinol y posee función antioxidante por su capacidad de atrapar al oxígeno singulete.

**Catalasa:** Enzima hemoproteica que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

**Citocromo c:** Proteína de la membrana interna mitocondrial que participa en la cadena de transporte de electrones, aceptando electrones del ubiquinol-citocromo c reductasa y los transfiere a la citocromo c oxidasa.

**Dismutación:** Las reacciones de dismutación son aquellas en las cuales los productos son obtenidos por reducción y oxidación del mismo átomo o molécula.

**Estado fundamental:-** El estado con el menor contenido de energía de un átomo o molécula.

**Estrés:** Conjunto de respuestas fisiológicas que ocurren como reacción a un disturbio ambiental o metabólico que desvíen al organismo de su homeostasis.

**Estrés oxidativo:** Es un desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y las defensas antioxidantes, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales provocan el deterioro y la muerte celular.

**Hepatopáncreas:** Glándula anexa al tubo digestivo, que desempeña una función análoga a la del hígado y el páncreas de los vertebrados. Se encarga de la producción de las enzimas y absorción de alimentos. Algunos autores proponen que se llame glándula del intestino medio o digestivo.

**Hipoxia:** Niveles ambientales de oxígeno reducido.

**Glucólisis:** Ruta metabólica por la que hexosas como la glucosa, son degradadas en sustancias más simples como piruvato y lactato.

**Metabolismo anaerobio:** Metabolismo sin utilización de oxígeno molecular

**Oxidación:** La combinación de una sustancia con el oxígeno, o en general cualquier reacción en la que un átomo pierde electrones.

**Oxígeno singlete:** Configuración electrónica del oxígeno que no presenta electrones no apareado. Esta forma contiene un exceso de energía con respecto al estado fundamental.

**Oxígeno triplete:** Configuración electrónica del oxígeno en su estado fundamental. Posee dos electrones no apareados con espines paralelos.

**Peroxidación de lípidos:** Es la incorporación de oxígeno en aquellos lípidos que contienen uno o más dobles enlaces entre sus átomos de carbono. Este proceso conduce a la rancidez de aceites, grasas y margarinas y en sistemas biológicos determina el daño en membranas.

**Radicales libres:** Es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos.

**Reducción:** Cualquier reacción en la que un átomo o molécula gana electrones. Los electrones tomados por la sustancia que se reduce son suministrados por otras sustancias que son oxidadas.

**Solución isotónica:** Solución que tiene la misma concentración del soluto y solvente que la solución con la cual se compara.

## ABREVIATURAS

TCA	Ácido tricloroacético
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
EROs	Especies reactivas de oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
·OH	Radical hidroxilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
UPS	Unidades practicas de salinidad
TBARS	Peroxidación de lípidos
SIC	Solución Isotónica para Crustáceos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
SDS	Solución de dodecilsulfato de sodio
ANOVA	Análisis de varianza
MANOVA	Análisis factorial
SOD	Superóxido dismutasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S transferasa
MDA	Ácido molondialdehido
GRH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado

## RESUMEN

La exposición de camarones a hipoxia ambiental seguido de una reoxigenación es frecuente en los estanques de cultivo debido a la alta densidad de organismos en cultivo, niveles elevados o bajos de productividad primaria, la falta de recambio de agua, etc. Estos factores afectan la conducta y los procesos fisiológicos de los organismos, ocasionando lento crecimiento y frecuentemente la muerte. En este trabajo, se estudiaron los indicadores de estrés oxidativo en respuesta a hipoxia y reoxigenación en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). En una primera fase experimental se evaluó la respuesta de los camarones a hipoxia ambiental (1 mg O<sub>2</sub>/L) durante 6, 12 y 24 horas más 1 hora de reoxigenación. En la segunda fase experimental se evaluó el efecto de la reoxigenación (1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas) después de un periodo de 24 horas de hipoxia. Adicionalmente, se expusieron camarones en condiciones basales de oxígeno (5 – 6 mg O<sub>2</sub>/L) en cada fase experimental. Se utilizaron métodos colorimétricos para evaluar la participación del metabolismo anaerobio (lactato total), producción de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peroxidación de lípidos (TBARS) y la capacidad antioxidante total. En la primera fase no se encontró efecto por el tiempo de exposición a hipoxia. Esto confirma que el camarón blanco soporta concentraciones de 1 mg de O<sub>2</sub>/L, ya que está muy por encima del punto crítico que se ha reportado para esta especie. En la segunda etapa, se determinó que el tiempo de reoxigenación afecta el metabolismo oxidativo del camarón blanco. El músculo de los organismos expuestos a 2 horas de reoxigenación presentó mayor producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y altos niveles de capacidad antioxidante total. La capacidad antioxidante total disminuyó a las 5 horas de reoxigenación; esta disminución de la capacidad antioxidante se reflejó en el incremento de la TBARS. Por lo tanto, quizá el daño producido por los radicales libres presentes a las 2 horas de reoxigenación se evidenció en los camarones expuestos a 5 horas de reoxigenación. Esto podría traer como consecuencia que el producto de cultivo expuesto a hipoxia moderada y reoxigenación abrupta sea de baja calidad. En los camarones mantenidos bajo condiciones basales, en las dos fases experimentales, se observaron diferencias significativas entre músculo, branquias y hepatopáncreas, lo que refleja que los tejidos de los camarones blancos presentan diferencias en el metabolismo oxidativo. A partir de los resultados de este estudio se destaca que la hipoxia moderada no tiene efecto sobre el metabolismo oxidativo del camarón blanco; sin embargo, el tiempo de reoxigenación transcurrido después de un período de hipoxia moderada tiene efecto directo en el metabolismo oxidativo del camarón blanco.

## ABSTRACT

Exposure of shrimp to environmental hypoxia and reoxygenation is a common occurrence in aquaculture due to high density of organisms in the ponds, extreme levels of primary productivity, lack of water exchange, etc. These factors affect the behavior and physiological processes of the organisms, producing slow growth and often death. In this study the markers of oxidative stress in response to hypoxia and reoxygenation were assessed in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). In a first experimental phase the response to environmental hypoxia (1 mg O<sub>2</sub>/L) for 6, 12 and 24 hours plus 1 hour of reoxygenation was evaluated. In the second experimental phase the effect of reoxygenation (1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours) following a 24 hour period of hypoxia was evaluated. In addition, shrimp were exposed to basal oxygen conditions (6 mg O<sub>2</sub>/L) during both experimental phases. Colorimetric methods were used to analyze the participation of anaerobic metabolism (total lactate), production of superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), lipid peroxidation (TBARS) and total antioxidant capacity. In the first phase no effect of the duration of exposure to hypoxia was found. This confirms that the white shrimp tolerates levels of 1 mg O<sub>2</sub>/L, which is far above the reported critical point for this species. In the second experimental phase the reoxygenation time was found to affect the oxidative metabolism of shrimp. The muscle of those organisms exposed to 2 hours of reoxygenation showed higher O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and elevated levels of total antioxidant capacity. The total antioxidant capacity decreased at 5 h of reoxygenation; this decrease was reflected in the increase of TBARS. Therefore, perhaps the damage produced by free radicals present at 2 hours of reoxygenation was evidenced in shrimp exposed to 5 hours of reoxygenation. This could bring as a consequence that the aquaculture product exposed to moderate hypoxia and sudden reoxygenation be of low quality. In those shrimp maintained under basal conditions, in both experimental phases, significative differences between muscle, gill and hepatopancreas were found, which reflects that the tissues of white shrimp show differences in the oxidative metabolism. These results suggest that moderate hypoxia does not have effect on the oxidative metabolism of white shrimp; however, the reoxygenation time elapsed after a period of moderate hypoxia has a direct effect on the oxidative metabolism of white shrimp.



## INTRODUCCIÓN

Los camarones son organismos que presentan su cuerpo protegido por una cubierta gruesa de quitina, la cual necesitan mudar para crecer; viven en agua marina, salobre o dulce, sobre fondos fangosos y arenosos. Los adultos se pueden encontrar en aguas costeras hasta los 70 metros de profundidad y, las etapas de postlarva a juvenil se encuentran en aguas estuarinas (Martínez-Córdova, 1993; Hendrickx, 1996).

En el Pacífico oriental hay más de 20 especies, siendo principalmente *Litopenaeus vannamei* (camarón blanco), *L. stylirostris* (camarón azul) y *Farfantepenaeus californiensis* (camarón café) las que se explotan comercialmente y forman parte de la alimentación humana (Martínez-Córdova, 1993). El camarón blanco se distribuye desde Sonora, en el Golfo de California, México, hasta las costas de Perú (Hendrickx, 1995).

El hombre ha explotado el recurso camarón desde hace mucho tiempo, con el propósito de satisfacer sus necesidades alimenticias. La pesca de este recurso es a través del uso de redes de arrastre en las regiones costeras de fondo compuesto principalmente por arena; los volúmenes de capturas de año a año son muy variables, razón por la cual, se desarrolló la acuicultura del camarón, como una alternativa para incrementar la producción de dicho recurso (Morán-Morales, 2003).

En México se cultiva principalmente el camarón blanco (*L. vannamei*), en los estados de Sinaloa, Nayarit y Baja California Sur (Rosenberry, 2001). Entre las principales características que propiciaron su cultivo se encuentran: a) un rápido crecimiento, ya que puede alcanzar la talla comercial de 20 g en un lapso de 4 a 6 meses, b) se puede cultivar en altas densidades, que van de 50,000 a 75,000 camarones por hectárea, con buenos resultados de supervivencia, que llegan a oscilar entre 60 y 80% (Martínez-Córdova, 1993), y c) toleran amplios intervalos de temperatura y salinidad. Por lo anterior, *L. vannamei* es una de las especies más apreciadas por los acuicultores, no sólo por su excelente rendimiento en términos de crecimiento y sobrevivencia, sino por su alto valor en el mercado (Martínez-Córdova, 1993).

La producción de camarón en México en el periodo de 1990-2000, aumento de 60,300 toneladas en 1990 a 95,100 toneladas en el 2000. Aunque la mayor parte de esta captura total de camarón se realizó en altamar y esteros. El cultivo de camarón adquirió en el mismo periodo una gran importancia. alcanzando un crecimiento promedio anual de 5.2% en la actividad de acuicultura generó una producción de 4,225 toneladas en 1990 y 33,480 toneladas en el año 2000, lo que reflejó gran

dinamismo en el desarrollo de la actividad acuícola (BANCOMEXT, 1999). La camaronicultura se ha constituido en la actualidad como una industria floreciente, llamando la atención de grandes empresas, y por lo tanto, se ha dado mucha importancia al estudio de nuevas tecnologías que impulsen el desarrollo de esta actividad (Carreño-León, 2000). Es evidente la necesidad de conocer más sobre la biología de la especie, principalmente los aspectos fisiológicos y metabólicos, que ayudarían a entender su comportamiento bajo condiciones específicas de crecimiento, y así lograr un óptimo desarrollo (Bray y Lawrence, 1992).

En la camaronicultura, como en la acuicultura en general, se han presentado una serie de problemas a resolver con respecto a la supervivencia, crecimiento, reproducción, productividad, enfermedades, entre otros. Por lo anterior, a la fecha se han realizado estudios sobre estrategias de adaptación, entre los que se pueden mencionar, las conductas o estrategias para soportar bajas concentraciones de oxígeno ( $O_2$ ) (Seidman y Lawrence, 1985; Bridges y Brand, 1980; Silva y Regnault, 1980; Herreid II, 1980), tasa de consumo de  $O_2$  (Villareal *et al.*, 1994), y respuesta a exposición a amonio, bacterias y contaminación con metales (Cheng *et al.*, 2003).

Las constantes exposiciones a hipoxia (bajas concentraciones de  $O_2$  disuelto) en los estanques de cultivo, provocadas por factores como la productividad primaria alta y baja, alta densidad del camarón, mal manejo de alimento, exceso de materia orgánica en descomposición y la falta de cambios de agua (BANCOMEXT, 1999) afectan la conducta y la fisiología normal de los crustáceos (Herreid II, 1980; Fandrey, 1995; Wu, 2002). Como resultado de lo anterior se altera el óptimo desarrollo de los camarones, reflejándose en la reducción de la frecuencia de muda, retardando el crecimiento y causando la muerte (Seidman y Lawrence, 1985; Silva y Regnault, 1980; Penkoff y Thurberg, 1982; Wu, 2002; Cheng *et al.*, 2003).

El  $O_2$  desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular, por lo que constituye el soporte de la vida aeróbica. Sin embargo, el desbalance entre la producción de especies reactivas de  $O_2$  (EROs) y las defensas antioxidantes llevan a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los que provocan el deterioro y muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 2000). Los seres vivos utilizan el  $O_2$  durante la respiración celular para obtener energía, sin embargo, éste puede ser tóxico tanto para los organismos aeróbicos como para los anaeróbicos debido a los metabolitos que se forman durante la reducción de  $O_2$ . Entre las EROs, se encuentran superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), los cuales pueden reaccionar con moléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN),

causando daño estructural y funcional en la célula (Halliwell y Gutteridge, 1992). La célula también tiene un sistema antioxidante que la protege de los efectos de EROs; este sistema está conformado por enzimas y otras moléculas que reaccionan formando barreras de defensa. En este trabajo, se evaluó la respuesta metabólica del estado de estrés oxidativo en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuesto a hipoxia ambiental e hipoxia ambiental con reoxigenación subsiguiente.

## ANTECEDENTES

Uno de los problemas que se han presentado desde los inicios del desarrollo de la acuicultura es el manejo al que son sometidas muchas especies comercialmente importantes durante su captura, transporte, manipulación y mantenimiento en estanques de cultivo; este manejo induce una respuesta a estrés (Carreño-León, 2000). En este contexto, el estrés es definido como “un conjunto de respuestas fisiológicas que ocurren como reacción a un disturbio ambiental o metabólico que desvíen al organismo de su homeostasis” (Selye, 1956).

El estrés se puede clasificar dependiendo de las condiciones en las que se presenten: a) estrés agudo, producido en un evento puntual, como la captura y manipulación de los organismos y, b) estrés crónico, producido por eventos de mayor duración, como son las condiciones ambientales a las que son sometidos en cultivo (Thomas, 1990).

Las respuestas de estrés se pueden clasificar de acuerdo a las alteraciones fisiológicas, conductuales y genéticas que ocurren en los organismos. En los peces en cultivo, se han descrito tres niveles de respuesta: a) respuestas neuronales y neuroendocrinas, como son la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y del sistema simpato-adrenal, b) respuestas en la química sanguínea incluyendo, cambios tisulares, cambios bioenergéticos y cambios en el balance de electrolitos, y c) alteraciones de las principales funciones bioquímicas y desbalance en los procesos de crecimiento y reproducción, así como incremento en la susceptibilidad a enfermedades por el debilitamiento del organismo (Wedemeyer y McLean, 1981; Thomas, 1990).

Existen muchos factores que pueden ocasionar una respuesta de estrés en los organismos como son, excesiva actividad o trabajo muscular, contaminantes, cambios drásticos de pH, temperatura, O<sub>2</sub>, y salinidad, que propician cambios fisiológicos y metabólicos en el animal y, en muchos casos pueden producir afecciones serias (Carreño-León, 2000). Los organismos responden a estos factores de diferentes formas, algunas son conductuales y otras metabólicas; sin embargo, ambas respuestas dependen del estado fisiológico del organismo y de sus interacciones entre dichos factores (Bridges y Brand, 1980; Herreid II, 1980; Fandrey, 1995; Villareal *et al.*, 1994; Wu, 2002; Chen *et al.*, 2002, 2003). En varias especies de camarón se ha demostrado que variaciones en la temperatura ambiental afectan de manera directa la tasa metabólica (Newell, 1969; Nelson *et al.*, 1977; Armitage y Wall, 1982; Dalla-Via, 1987; Kurmaly *et al.*, 1989; Villarreal y Ocampo, 1993; Villarreal y Rivera, 1993). Además, se ha reportado en camarones que el consumo de O<sub>2</sub> es directamente proporcional a la

temperatura (Chen y Kuo, 1996; Villarreal *et al.*, 1994; Jiann-Chu y Sen-Huan, 1993); y que un incremento de 10°C en el agua de cultivo incrementa las tasas metabólicas al doble o triple, a menos que el organismo tenga una estrategia adaptativa que contrarreste el efecto de la temperatura (Armitage y Wall, 1982). Otro factor que afecta el comportamiento y metabolismo de los camarones es la salinidad. Diversos autores encontraron que el consumo de O<sub>2</sub> en juveniles de *P. chinensis* disminuye con el incremento en los niveles de salinidad (Rosas *et al.*, 1999; McNamara, 1982; Díaz-Herrera y Bucle-Ramírez, 1993; Chen y Lin, 1995). En el camarón, la tasa respiratoria también está afectada por los niveles ambientales de O<sub>2</sub> e intensidad de luz (Bridges y Brand, 1980), y por variables endógenas como edad, estado nutricional, sexo, actividad motora, estadio de muda y ritmo biológico (Wolvekamp y Waterman, 1960).

Uno de los factores de estrés que más se ha estudiado es la baja concentración de O<sub>2</sub> en el medio (hipoxia) o bien ausencia total de éste (anoxia), lo cual provoca varias respuestas fisiológicas y conductuales en los organismos (Carreño-León, 2000). Los organismos presentan diversos cambios de comportamiento para contrarrestar los efectos de hipoxia, lo que depende básicamente de sus hábitos; si son organismos móviles pueden responder desplazándose a sitios con mayor cantidad de O<sub>2</sub>, otros tienden a aumentar el área de superficie para el intercambio de gases, reducen su actividad conservando energía y O<sub>2</sub>, como respuesta compensatoria, por lo que la mayoría disminuye su movilidad (Wu, 2002; Cheng *et al.*, 2003).

El nivel de oxígeno disuelto es la variable más limitante en el agua de estanquería de cultivo intensivo (Boyd y Watten, 1989). Bajos niveles de oxígeno disuelto pueden reducir el crecimiento y la alimentación y, frecuentemente causan mortalidades (Cheng *et al.*, 2002). La presencia de blooms algales causa estrés y mortalidad en cangrejos en cultivos; una aereación de emergencia puede prevenir mortalidad de dichos organismos (Allan y Maguire, 1991). Además, una alta o baja productividad primaria; alta densidad del camarón en el estanque; manejo inadecuado del alimento; alta concentración de materia orgánica y cambios de agua en los estanques de cultivo, pueden tener influencia en el comportamiento de la concentración de O<sub>2</sub> (BANCOMEXT, 1999). El control de O<sub>2</sub> es de gran importancia particularmente durante las horas de la madrugada, cuando la actividad de respiración de la biomasa de microalgas presente en el estanque, pueden abatir drásticamente el nivel de O<sub>2</sub> y provocar mortalidades importantes. Boyd (1989) destaca que un decremento en el nivel de O<sub>2</sub> influye con mayor frecuencia en el crecimiento del camarón, haciéndolo más lento y, más susceptibles a enfermarse.

Los camarones son reguladores de O<sub>2</sub>, consumen éste a una tasa independiente de los niveles decrecientes de oxígeno disuelto en el ambiente, hasta un punto de saturación crítico (llamado punto crítico) en el cual el consumo se vuelve dependiente de la concentración de O<sub>2</sub> (McMahon *et al.*, 1974; Seidman y Lawrence, 1985; Villarreal, 1990). Las bajas concentraciones de oxígeno disuelto (hipoxia, definida como oxígeno disuelto por abajo de 2.8 mg O<sub>2</sub>/L) afectan la conducta y la fisiología normal de los crustáceos (Herreid II, 1980; Fandrey, 1995; Wu, 2002) impidiendo su óptimo desarrollo, reflejándose en la reducción de la frecuencia de muda, retardando el crecimiento y causando mortalidades (Silva y Regnault, 1980; Penkoff y Thurberg, 1982; Wu, 2002; Seidman y Lawrence, 1985; Chen *et al.*, 2003). Así, los niveles de oxígeno disuelto en el agua de un estanque están directamente relacionados con el bienestar o salud del camarón, los cuales pueden ser críticos (Allan y Maguire, 1991). Al respecto, se ha demostrado en numerosas especies de peneidos, incluidos *Penaeus japonicus*, *P. kerathurus*, *P. schmitti* y *P. monodon*, que niveles bajos de O<sub>2</sub> entre 0 y 1 mg O<sub>2</sub>/L son letales, niveles entre 1 y 1.5 mg O<sub>2</sub>/L son letales en exposición prolongada y, que a niveles entre 1.7 y 3.0 mg O<sub>2</sub>/L provocan retardo en el crecimiento de los organismos por la pobre conversión alimenticia, haciéndolos más susceptibles a enfermedades (Nicovita, 2001).

Existe considerable número de estudios sobre las vías metabólicas alternas empleadas por los crustáceos para resistir y sobrevivir en condiciones de hipoxia ambiental y, en particular, sobre el metabolismo anaerobio de los crustáceos (Pritchard y Eddy, 1979; Bridges y Brand, 1980; Albert y Ellington, 1985; Taylor y Spicer, 1987; Chew y Llow, 1991; Hill *et al.*, 1991; Zeis *et al.*, 1992). También las adaptaciones respiratorias y circulatorias ante condiciones de hipoxia ambiental han sido documentadas en extenso (Cameron y Mágnun, 1993; Morris *et al.*, 1996). Pero es poco el conocimiento sobre la participación del metabolismo anaerobio en tejidos del camarón blanco, en respuesta a una hipoxia prolongada seguida de un proceso de reoxigenación. El entendimiento de las funciones metabólicas anaerobias en los tejidos del camarón son de gran importancia para conocer cuál es la capacidad de adaptación y de soporte de dichos tejidos en condiciones de hipoxia prolongada con reoxigenación subsiguiente (Albert y Ellington, 1985). En experimentos bajo condiciones de hipoxia y anoxia se han encontrado altas concentraciones de lactato en el músculo, así como disminución evidente de glucógeno, lo cual sugiere que este último es utilizado como sustrato durante el metabolismo anaerobio con producción de lactato (Zebe, 1982; Van Aardt y Wolmarans, 1987; Van Aardt, 1988).

El O<sub>2</sub> es un componente vital para el mantenimiento de la vida, pero también es inherentemente tóxico debido a los productos secundarios de su metabolismo. Aproximadamente el 5% del O<sub>2</sub> consumido es convertido a especies reactivas de O<sub>2</sub> (EROs) en su reducción durante la respiración celular normal (Fridovich, 1998). Una producción excesiva de EROs genera la condición de “estrés oxidativo”, definido como una pérdida del balance entre la producción de moléculas oxidantes y las defensas antioxidantes del organismo, lo cual puede generar daño a células y tejidos (Sies, 1993).

Las EROs engloban a los radicales libres, que son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos (Martínez-Cayuela, 1998). Como consecuencia de poseer electrones desapareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas, tienen una vida media corta, y su concentración en estado estacionario es baja (Martínez-Cayuela, 1998; Halliwell y Gutteridge, 1999). Las EROs se forman como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales como hipoxia/reoxigenación, contaminantes y luz ultravioleta (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las EROs dañan macromoléculas tales como los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos de la membrana (Halliwell *et al.*, 1992). Como resultado de ello, la integridad de la estructura y de la función de las células, así como el material genético de la célula, se ven afectados. Las EROs por sí solas pueden inducir muerte celular mediante daños a proteínas y lípidos, mientras que las reacciones entre las EROs y elementos subcelulares, particularmente neurotransmisores, pueden llevar a la formación de toxinas endógenas (Volicer y Crino, 1990). El daño por EROs en organismos está relacionado a muchas enfermedades, tales como arteriosclerosis, isquemia-reperfusión y embolia, se acumula con la edad, y puede estar relacionado con la producción de neurotoxinas en crustáceos de valor comercial (Poeggeler *et al.*, 1993; Reiter, 1995).

Existen en las células, mecanismos de defensa que neutralizan las EROs y evitan sus efectos dañinos. A estas defensas se les denominan antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que, en concentraciones normales, posea una alta afinidad para interactuar con un radical libre. Los antioxidantes reaccionan directamente con las EROs para transformarlas en moléculas menos reactivas (por ejemplo, vitamina E), catalizar reacciones químicas acelerando el metabolismo de las EROs (por ejemplo, superóxido dismutasa (SOD), catalasa y los glutationes), o reparan el daño ocasionado por EROs (por ejemplo, endo- y exo-nucleasas) (Gil-del Valle *et al.*, 1999; Pérez y Pérez, 2000). Así mismo, existe una variedad de quelantes de metales pesados, que también evitan la formación de EROs (Blake y Winyard, 1995; Toyokuni, 1996).

Varios autores han utilizado el metabolismo oxidativo para evaluar los daños producidos a organismos por agentes altamente oxidantes. Estos estudios se han llevado a cabo en organismos acuáticos con la finalidad de desarrollar biomarcadores que permitan detectar condiciones de estrés oxidativo. Por ejemplo, Nusetti *et al.* (2001), encontraron que los niveles de peroxidación de lípidos (MDA), se incrementan en el poliqueto, *Eurithoa complata* cuando son expuestos a bajas concentraciones de cobre durante 7 días, mientras que los niveles de glutatión reductasa (GR) disminuyen. Así otros autores han buscado biomarcadores que se presentan cuando los organismos se encuentren bajo condiciones ambientales extremas. Al respecto, Pannunzio y Storey (1998), encontraron en *Littorina littorea*, menor actividad de las enzimas SOD, catalasa, glutatión-S-transferasa (GST) y GR cuando fueron mantenidos en anoxia durante 6 días. Pascual *et al.* (2003), determinaron que en el pez *Sparus aurata* mantenidos sin alimentación, que los niveles de MDA y de glutatión oxidado se incrementaron durante las tres primeras semanas a la que fueron expuestos. Ansaldo *et al.* (2000) experimentaron con peces del ártico *Notothenia rossi* y *Dissostichus eleginoides* (peces de sangre roja) presentaron mayor actividad de la enzima SOD en comparación con los peces *Chaenocephalus aceratus*, *Champsocephalus gunnari* y *Pseudochaenichthys georgianus* de sangre blanca.

Varios autores han realizado estudios para detectar la presencia de las defensas antioxidantes que ayudan a los animales para soportar la falta de oxígeno ambiental. Al respecto, Hermes-Lima *et al.* (2000), determinaron que en la serpiente lisa, *Thamnophis sirtalis* se observan incrementos de catalasa y SOD cuando son expuestos a anoxia, pero estos niveles disminuyen cuando los organismos se congelan durante el invierno. Adicionalmente, señalan que en el pez, *Carassius auratus* incrementan los niveles de catalasa y GST en los tejidos hígado y cerebro cuando son expuestos a anoxia y reoxigenación.



## JUSTIFICACIÓN

El cultivo de camarón en México, como en todo el mundo, enfrenta una serie de problemas debido al manejo inadecuado de los sistemas y la falta de conocimiento sobre la biología y la fisiología en general de la especie a cultivar. Estos problemas pueden conducir a bajas tasas de crecimiento y sobrevivencia, ocasionando problemas de producción y, consecuentemente menores ingresos.

Un problema recurrente en acuicultura es la exposición a hipoxia y reoxigenación, situación que puede resultar de altas densidades de organismos en cultivo, sobrealimentación, circulación inadecuada de agua, fallas de equipo o errores humanos. El estrés oxidativo es inducido por una súbita reintroducción de O<sub>2</sub> (reoxigenación) a tejidos hipóxicos, cuando los radicales libres producidos sobrepasan las defensas antioxidantes.

La producción excesiva de los radicales libres puede llevar a la peroxidación de lípidos de membrana, despolimerización de polisacáridos, inhibición de enzimas, estimulación del metabolismo de lipooxigenasas y rompimiento de la hebra del ADN, y conducir así a daños celulares y tisulares (interferencia con la función de organelos, propiciando la muerte celular y necrosis de tejidos). El daño celular y tisular generado por los radicales libres hace que los animales sean más susceptibles a infecciones microbianas y compromete la calidad del producto. Sin embargo, poco esfuerzo de investigación se ha dedicado al estudio del metabolismo de los radicales libres, los mecanismos específicos que protegen a los tejidos de la producción de radicales libres y las vías que permiten reparar los efectos dañinos de los radicales libres en animales marinos silvestres y en acuicultura. Por lo que, en este trabajo se evaluó la respuesta del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) a condiciones experimentales de hipoxia y reoxigenación en términos del metabolismo oxidativo.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta, en términos de estrés oxidativo, del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuesto a hipoxia ambiental e hipoxia ambiental seguido de una reoxigenación.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Evaluar la participación del metabolismo anaerobio en condiciones de hipoxia ambiental e hipoxia ambiental seguida de una reoxigenación.

2.- Evaluar la producción de las EROs en respuesta a hipoxia ambiental e hipoxia ambiental más reoxigenación.

3.- Evaluar los daños celulares producidos por las EROs en respuesta a hipoxia ambiental e hipoxia ambiental más reoxigenación.

4.- Determinar los mecanismos protectores contra las EROs en respuesta a hipoxia ambiental e hipoxia ambiental más reoxigenación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo los camarones fueron obtenidos de los estanques supralitorales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y de la granja camaronesa APSA. Se utilizaron camarones, de entre 10 y 15 gramos de peso, los cuales fueron mantenidos en una tina con 1,200 litros de agua de mar (capacidad máxima 1,500 litros), a una densidad de 50 organismos/m<sup>2</sup>. Se mantuvieron condiciones controladas de O<sub>2</sub> ( $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L), salinidad ( $37.78 \pm 0.10$  ups) y temperatura ( $24.90 \pm 0.10$  °C). Los camarones se aclimataron durante una semana; en este tiempo los organismos fueron alimentados con pelletizado comercial PIASA, suministrando una ración diaria de 5 % de la biomasa total de camarones; se realizó recambio diario de agua del 80 % de la capacidad, con la finalidad de eliminar las heces fecales, mudas y el alimento no consumido.

Previo a la fase experimental, los camarones se transportaron a recipientes de plástico con 40 litros de agua de mar (capacidad máxima de 60 litros), en cada recipiente se mantuvieron condiciones controladas de O<sub>2</sub>, temperatura y salinidad ( $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups, respectivamente). Se colocaron 16 camarones por recipiente, los cuales fueron marcados con un corte en el urópodo (figura 1) para dar seguimiento diario de muda; y así, seleccionar los camarones en fase de intermuda (3 a 7 días después de haber mudado) para efectuar la experimentación. Los camarones en período de intermuda fueron colocados individualmente en cubetas con 3.5 litros de agua de mar (4 litros máxima capacidad) y con una concentración de oxígeno de  $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups, Ahí se mantuvieron en ayuno durante 24 horas; al cabo de ese tiempo, los organismos fueron expuestos a condiciones de hipoxia y reoxigenación, de acuerdo al esquema descrito a continuación.

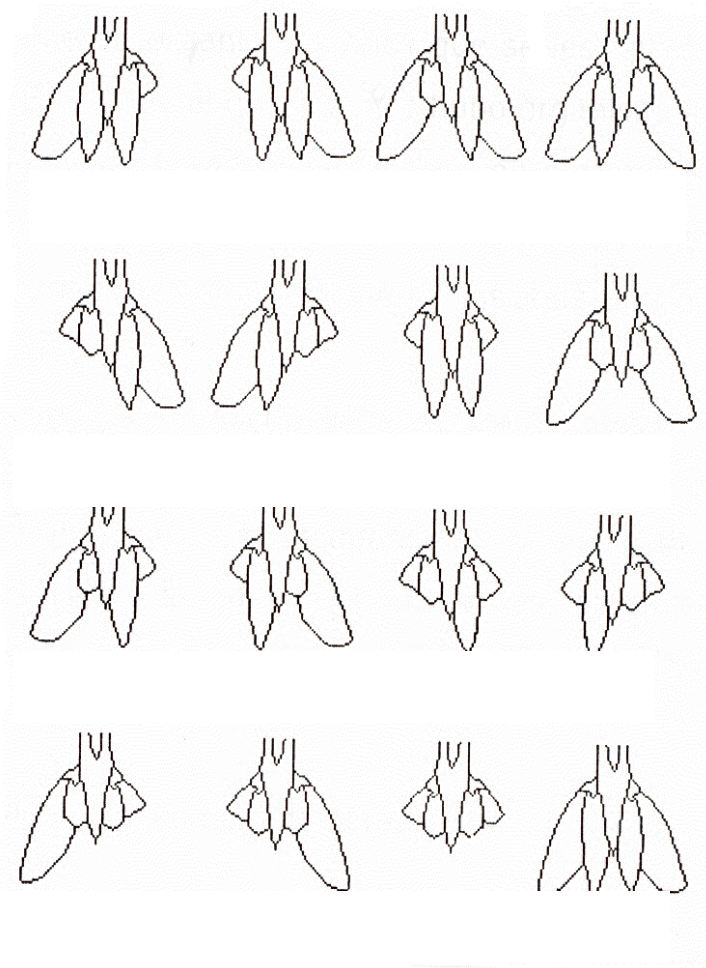


Figura 1.- Distintas marcas de urópodos de camarón para identificar organismos

## DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se desarrolló en dos fases experimentales.

### **PRIMERA FASE EXPERIMENTAL: Exposición a hipoxia (figura 2).**

Se utilizaron 3 grupos experimentales

**GRUPO CONTROL.** Se mantuvieron 6 camarones en condiciones basales de estanquerías de cultivo:  $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups, durante 6, 12 y 24 horas, correspondiendo al tiempo que duró la hipoxia en los tratamientos.

**GRUPO HIPOXIA.** Se redujo la concentración de oxígeno disuelto, mediante burbujeo con nitrógeno gaseoso, hasta 1 mg de O<sub>2</sub>/L, las condiciones de temperatura y salinidad se mantuvieron constantes ( $24.90 \pm 0.10$  °C,  $37.78 \pm 0.10$  ups, respectivamente). Se usaron 6 camarones en cada tratamiento (6, 12 y 24 horas).

**GRUPO REOXIGENACIÓN.** Se redujo la concentración de oxígeno disuelto, mediante burbujeo con nitrógeno gaseoso, hasta 1 mg de O<sub>2</sub>/L; las condiciones de temperatura y salinidad se mantuvieron constantes ( $24.90 \pm 0.10$  °C,  $37.78 \pm 0.10$  ups, respectivamente). Las condiciones de hipoxia se mantuvieron en los tratamientos 6, 12 y 24 horas; al final de cada tratamiento se burbujeó con aire, para reestablecer las condiciones iniciales de experimentación ( $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L), manteniendo el burbujeo durante 1 hora más. Se usaron 6 camarones en cada tratamiento (6, 12 y 24 horas).

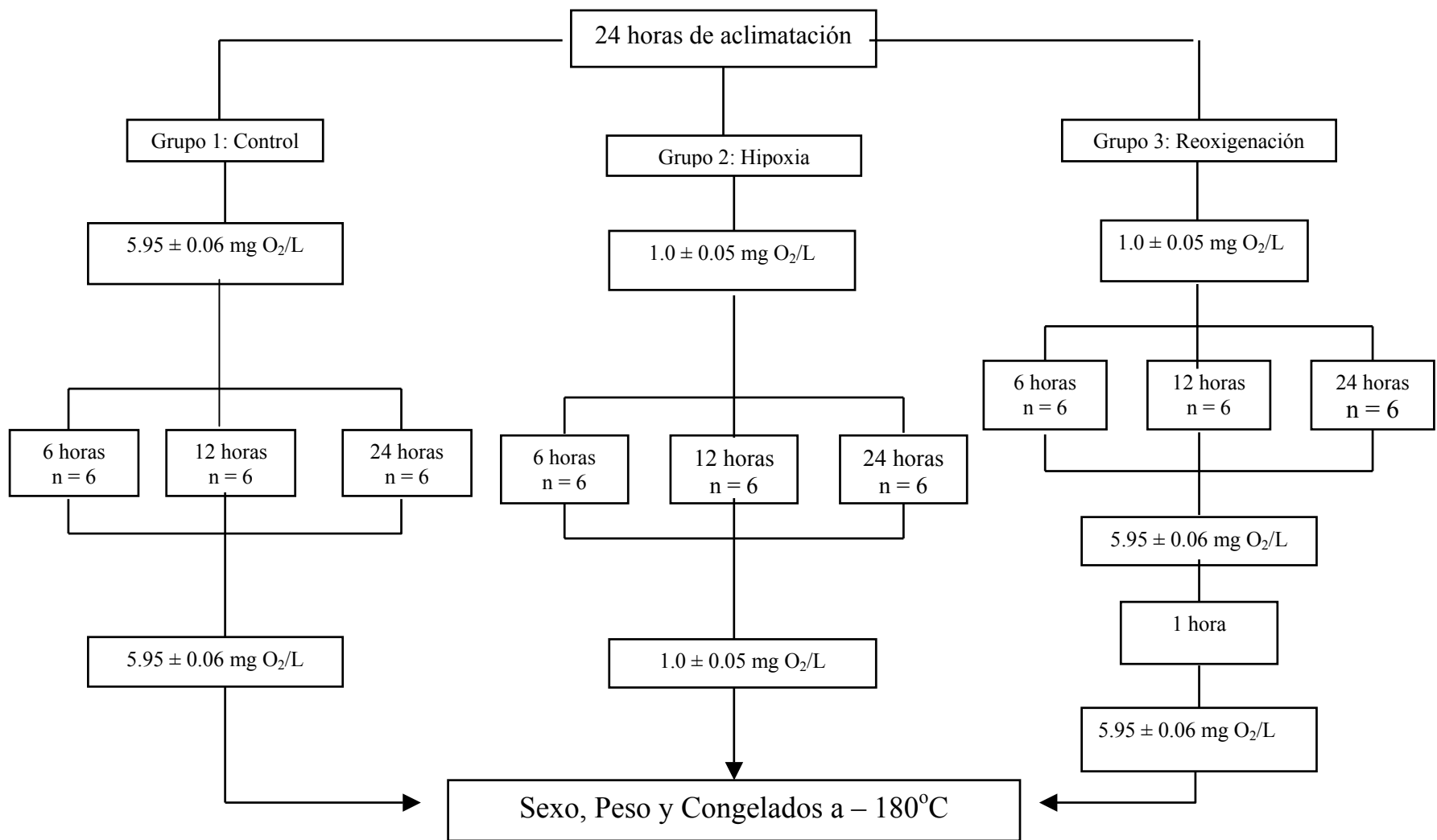


Figura 2. Diagrama de flujo del diseño experimental correspondiente a la primera fase.

## **SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL: Exposición a reoxigenación (figura 3)**

Se utilizaron 3 grupos experimentales para su desarrollo:

**GRUPO CONTROL.** Se mantuvieron camarones en condiciones basales de estanquerías de cultivo:  $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups, durante 24 horas. En cada tratamiento de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas se utilizaron 6 camarones.

**GRUPO HIPOXIA.** Se redujo la concentración de oxígeno disuelto, mediante burbujeo con nitrógeno gaseoso, hasta 1 mg de O<sub>2</sub>/L, durante 24 horas. Las condiciones de temperatura y salinidad se mantuvieron constantes ( $24.90 \pm 0.10$  °C,  $37.78 \pm 0.10$  ups, respectivamente). En cada tratamiento de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas se utilizaron 6 camarones.

**GRUPO REOXIGENACIÓN.** Se redujo la concentración de oxígeno disuelto, mediante burbujeo con nitrógeno gaseoso, hasta 1 mg de O<sub>2</sub>/L, durante 24 horas. Las condiciones de temperatura y salinidad se mantuvieron constantes ( $24.90 \pm 0.10$  °C,  $37.78 \pm 0.10$  ups respectivamente). Al final de este período se burbujeó con aire para reestablecer las condiciones iniciales ( $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L), y manteniendo el burbujeo en tratamientos de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. En cada tratamiento se usaron 6 camarones.

Al término de cada tratamiento experimental los organismos fueron sexados, pesados y sacrificados; se congelaron al instante por inmersión en nitrógeno líquido (-180 °C). Las muestras se guardaron en congelación a -80 °C hasta su procesamiento.

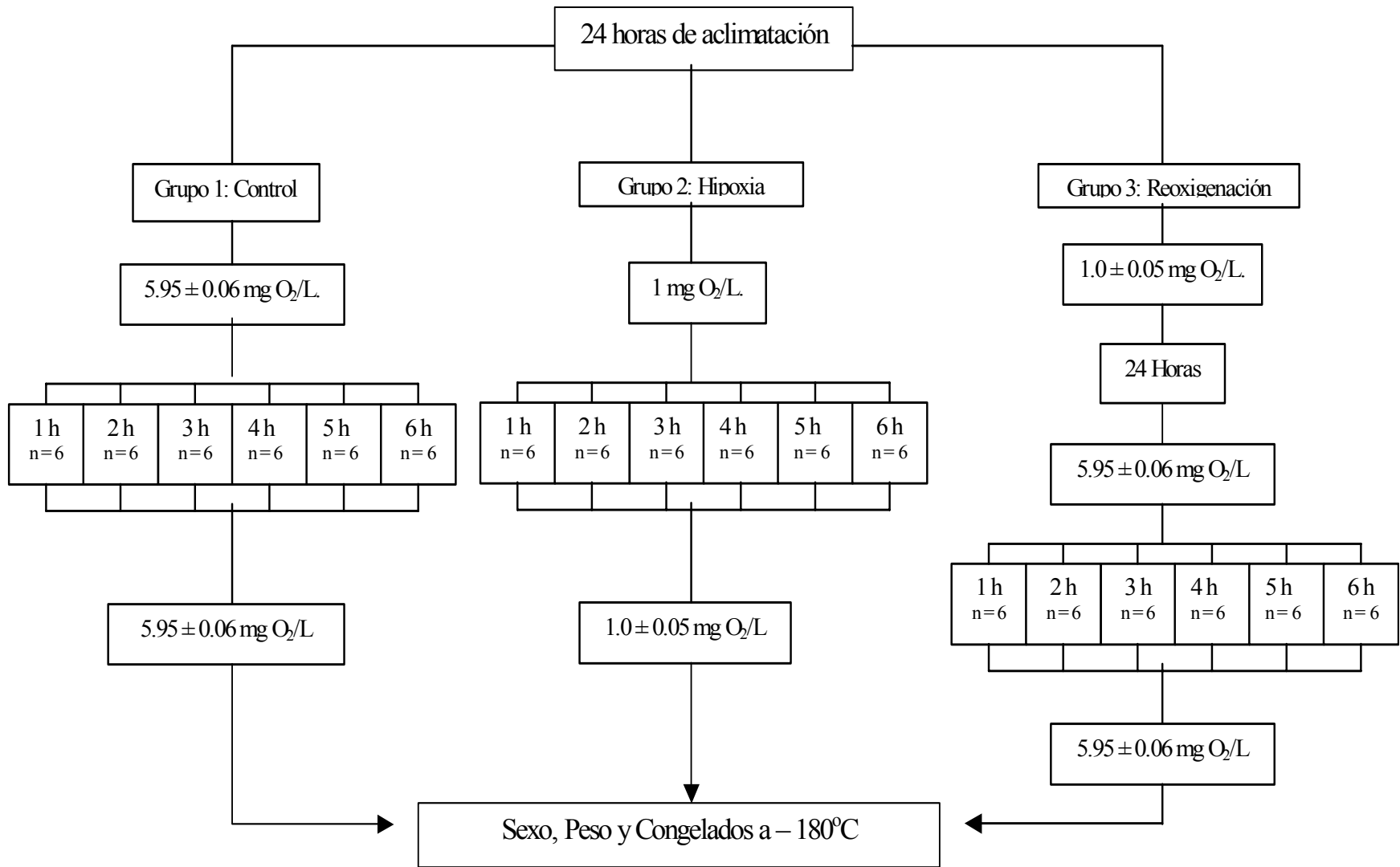


Figura 3.- Diagrama de flujo del diseño experimental correspondiente a la segunda fase.



## PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Del cefalotórax congelado de cada camarón se obtuvieron por disección, el músculo, las branquias y el hepatopáncreas para determinar el efecto del estrés oxidativo. En cada muestra se evaluaron la concentración de lactato total, producción de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total.

### Métodos

#### 1) Lactato total

La concentración de L-lactato fue determinada por triplicado en cada tejido como indicador de la participación del metabolismo anaerobio en camarón blanco, mediante el uso de un kit Sigma© (método No. 735). El principio del método es la reacción de la enzima lactato oxidasa que convierte el ácido láctico presente en la muestra a piruvato con formación de peróxido de hidrógeno; éste es oxidado por una peroxidasa formando un compuesto colorido, el cual es directamente proporcional a la concentración de lactato en la muestra.

Previo al análisis, las muestras de tejido (100 mg) fueron homogenizadas en ácido tricloroacético (TCA) al 10% en frío y centrifugadas a 3800 rpm por 10 minutos a 4°C; del sobrenadante de cada muestra se tomaron 20 µl y se hizo reaccionar con 200 µl de la solución reactiva por un periodo de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió su absorbancia a 560 nm. Se elaboró una curva patrón con la solución estándar, cuya concentración es de 40 mg/dL o mg/g, con las siguientes concentraciones 20, 10, 5, 2.5 y 0 mg/dL; como blanco se utilizó TCA al 10%. Los resultados fueron expresados en base al peso de la muestra (mg lactato/g peso húmedo).

#### 2) Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

La producción endógena de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se midió por triplicado en los extractos de los tejidos, usando espectrofotometría durante la reducción de ferricitocromo c (Drossos *et al.*, 1995). Cada muestra (100 mg) fue colectada en tubos de ensaye con 1 ml de solución amortiguadora Krebs bicarbonato. Después se agregó 1 ml citocromo c (Sigma) y se incubó durante 15 min a 37°C. Al final de este período, se agregó 1 ml de n-etilmaleimida (Sigma) para detener la reacción, se centrifugo a

3500 rpm durante 10 min; al término se tomó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 550 nm; obteniendo la lectura de muestra. Después de leída la absorbancia, se eliminó totalmente la solución quedando el tejido; a éste se le agregó 1 ml de la solución amortiguadora, 1 ml de n-etilmaleimida, y 1 ml de citocromo c; todo se puso a incubar durante 15 min a 37°C; al término de este período se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, se leyó la absorbancia del sobrenadante a 550 nm como el blanco de cada muestra. La tasa de reducción de  $O_2^-$  fue calculada restándole a la absorbancia de la muestra el blanco, el resultado se dividió por el coeficiente de extinción del ferricitocromo c a ferrocitocromo c,  $E_{550} = 21$  nm/cm. Los resultados se expresaron en nanomoles de  $O_2^-$  por minuto por gramo de tejido (peso húmedo).

### 3) Peroxidación de lípidos (TBARS)

La cantidad de peroxidación de lípidos (un indicador del daño generado por EROs) fue determinada como el contenido tisular de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, Persky, 2000). Los tejidos (100mg) fueron homogenizados (Polytron, Brinkmann Instruments, Westbary, NY) en una solución isotónica para crustáceos (SIC: NaCl 450 mM, KCl 10 mM), y se incubaron por triplicado durante 15 minutos a 37 °C. Al término de la incubación se agregaron 250  $\mu$ l de la solución inhibidora, para prevenir mayor peroxidación de lípidos, se agregaron 500  $\mu$ l de ácido tiobarbitúrico (TBA), y el homogenizado fue calentado por 15 min en un baño de agua hirviendo. Después de enfriarse a temperatura ambiente, el precipitado fue removido por centrifugación a 3800 rpm durante 10 min a 4 °C. La absorbancia del sobrenadante fue leída a 532 nm contra un blanco que contenía todos los reactivos excepto el tejido. La concentración de las TBARS fue calculada usando el coeficiente de extinción de  $1.56 \times 10^3$  M/cm y los resultados fueron expresados en nanomoles de TBARS por minuto por gramo de tejido (peso húmedo).

### 4) Capacidad Antioxidante Total (% inhibición)

Se midió la capacidad antioxidante total en los tejidos mediante una modificación al método de Ohkawa *et al.* (1979). Este método está basado en la inhibición de la lipoperoxidación espontánea de cerebro de rata Wistar. Se obtuvieron ratas macho de 250 a 300 g de peso corporal. Se extrajo el cerebro y se homogenizó en solución amortiguadora salina al 0.9% en una relación 1:10, se centrifugó a 2100 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se colectó en alícuotas de 1 ml. El sobrenadante se mantuvo en congelación a una temperatura de -80 °C previo al procesamiento. Se obtuvieron dos controles, uno para la máxima lipoperoxidación a 40 minutos ( $C_{40}$ ) y otro a tiempo cero ( $C_0$ ). El  $C_0$  se

compuso de 350 µl de ácido acético (utilizado para detener la reacción de lipoperoxidación espontánea), 25 µl de solución amortiguadora de fosfato y 25 µl de homogenizado de cerebro. El C<sub>40</sub> se compuso de 25 µl de solución amortiguadora de fosfato y 25 µl de homogenizado de cerebro.

Se obtuvo un control de muestra (M<sub>0</sub>) compuesto de 25 µl de solución amortiguadora de fosfato, de 350 µl de ácido acético y 25 µl de homogenizado de tejido. La muestra (M<sub>40</sub>) se analizó por adición de 25 µl de homogenizado de tejido (1:10 en SIC) y 25 µl de homogenizado de cerebro. Se incubaron los controles y muestras a 37 °C durante 40 minutos. Se colocaron los tubos en hielo y se agregó a los tubos correspondientes a M<sub>40</sub> y C<sub>40</sub>, 350 µl de ácido acético. Se añadieron 600 µl de solución de TBA y se incubó en un baño de agua a 85 °C por 60 minutos. Se colocaron los tubos en baño de hielo y se añadió solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%. Se centrifugó durante 10 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente. Se obtuvo el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 532 nm. La capacidad antioxidante se calculó como el porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación espontánea como sigue:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 (1 - ((M_{40} - M_0) - C_0) / (C_{40} - C_0))$$

donde:

**M<sub>40</sub>**, es la absorbancia de la muestra a la que se mide la inhibición

**M<sub>0</sub>**, es el control de la muestra

**C<sub>0</sub>**, es el control de la lipoperoxidación (a t = 0 minutos)

**C<sub>40</sub>**, es el control de la máxima lipoperoxidación (a t = 40 minutos)

Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición. Previo al tratamiento estadístico de datos, se obtuvo el porcentaje relativo de inhibición (en base a la mayor inhibición encontrada en las muestras) y se transformaron los datos a logaritmo base 10.

## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se realizaron las pruebas básicas de estadísticas descriptivas, obteniendo la media, desviación estándar y el error estándar. A los resultados se les aplicaron las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff (K-S), y el análisis de homogeneidad de varianzas de Barlett. Al cumplir con los supuestos se optó por recurrir a las estadísticas paramétricas para realizar las comparaciones. Los resultados fueron analizados de manera independiente para determinar: a) las diferencias entre tejidos (músculo, branquias y hepatopáncreas), b) la respuesta de los tejidos a las condiciones experimentales (control, hipoxia y reoxigenación), y c) el efecto en los tejidos de la duración de cada tratamiento experimental (6, 12 y 24 horas de hipoxia, y 1 hora de reoxigenación).

### Primera fase experimental

A cada variable (lactato total,  $O_2^-$ , TBARS y antioxidantes totales) se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para detectar diferencias entre los tejidos de los camarones expuestos a las condiciones control; posteriormente se realizó una prueba post hoc de Bonferroni para identificar diferencias puntuales. Este mismo tratamiento se realizó para determinar diferencias entre los grupos experimentales (hipoxia y reoxigenación) y entre los tratamientos (6, 12 y 24 horas de hipoxia, e hipoxia 6, 12 y 24 horas más 1 hora de reoxigenación). También se realizó el análisis factorial (MANOVA) para determinar las diferencias entre los tejidos, grupos experimentales y tratamientos.

### Segunda fase experimental

A cada variable (lactato total,  $O_2^-$ , TBARS y antioxidantes totales) se le realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para detectar diferencias entre los tejidos de los camarones expuestos a las condiciones control; posteriormente se realizó una prueba post hoc de Bonferroni para identificar diferencias puntuales. Este mismo tratamiento se realizó para determinar diferencias entre grupos experimentales (control, hipoxia y reoxigenación) y entre los tratamientos (24 horas de hipoxia más 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de reoxigenación). También se realizó el análisis factorial (MANOVA) para determinar las diferencias entre los tejidos, grupos experimentales y tratamientos.

El grado de significancia estadística que se consideró en este estudio fue  $p < 0.05$ . Se considero tendencia no significativa  $p < 0.1$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas estadísticos para computación EXCEL©, SYSTAT© Ver. 9 y STATISTICA© Ver 6.0.

## RESULTADOS

### PRIMERA FASE EXPERIMENTAL: Exposición a hipoxia.

#### COMPARACIÓN ENTRE TEJIDOS

Se compararon los niveles de lactato total,  $O_2^-$  TBARS y capacidad antioxidante total en los tejidos (músculo, branquias y hepatopáncreas) de los camarones mantenidos bajo condiciones control ( $5.95 \pm 0.06$  mg  $O_2/L$ ,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups). No se encontraron diferencias significativas en la concentración de lactato total entre el músculo, branquias y hepatopáncreas (figura 4A, tabla 1). El hepatopáncreas presentó mayor producción de  $O_2^-$  y altos niveles de TBARS, en comparación con las branquias y el músculo ( $p = 0.008$ ,  $p = 0.002$ , respectivamente; figura 4B y C, tabla 1). Las branquias presentaron mayor capacidad antioxidante en comparación con el músculo y el hepatopáncreas ( $p = 0.054$ , figura 4D y tabla. 1).

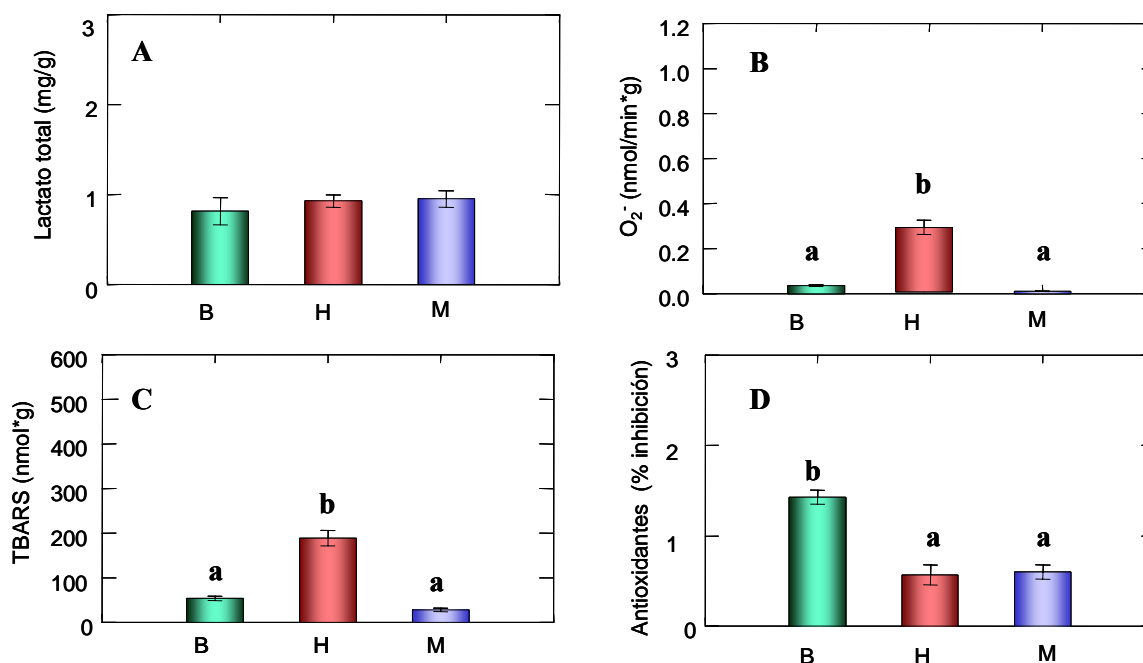


Figura 4. Metabolismo oxidativo en los tejidos de camarón blanco bajo condiciones control. B= Branquias, H= Hepatopáncreas, M= Músculo,  $O_2^-$  = producción de radical superóxido, TBARS =Peroxidación de lípidos.  $P < 0.05$  \* Diferencias significativas

#### CONTROL

No se encontraron diferencias en las concentraciones de lactato total, producción de  $O_2^-$ , TBARS y actividad antioxidante total, en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas de los camarones mantenidos en condiciones control ( $5.95 \pm 0.06$  mg  $O_2/L$ ,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups) 6, 12 y 24 horas (figuras 5, 6, 7 y tablas 2, 3, 4), lo cual se corroboró estadísticamente a través del ANOVA de 1 vía. Los resultados obtenidos en cada tejido se integraron, para ser comparada con los grupos experimentales de hipoxia y reoxigenación.

## HIPOXIA

No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones de hipoxia 6, 12 y 24 horas para ninguno de los tejidos analizados: músculo (figura 5, tabla 2), branquias (figura 6, tabla 3) y hepatopáncreas (figura 7, tabla 4).

## REOXIGENACIÓN

No se encontraron efectos significativos en las concentraciones de lactato total, producción de  $O_2^-$ , TBARS y actividad antioxidante total, en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas de los camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. No se encontraron diferencias significativas entre los tejidos para ninguno de los tratamientos 6, 12 y 24 horas (figura 5, 6, 7 y tablas 2, 3, 4).

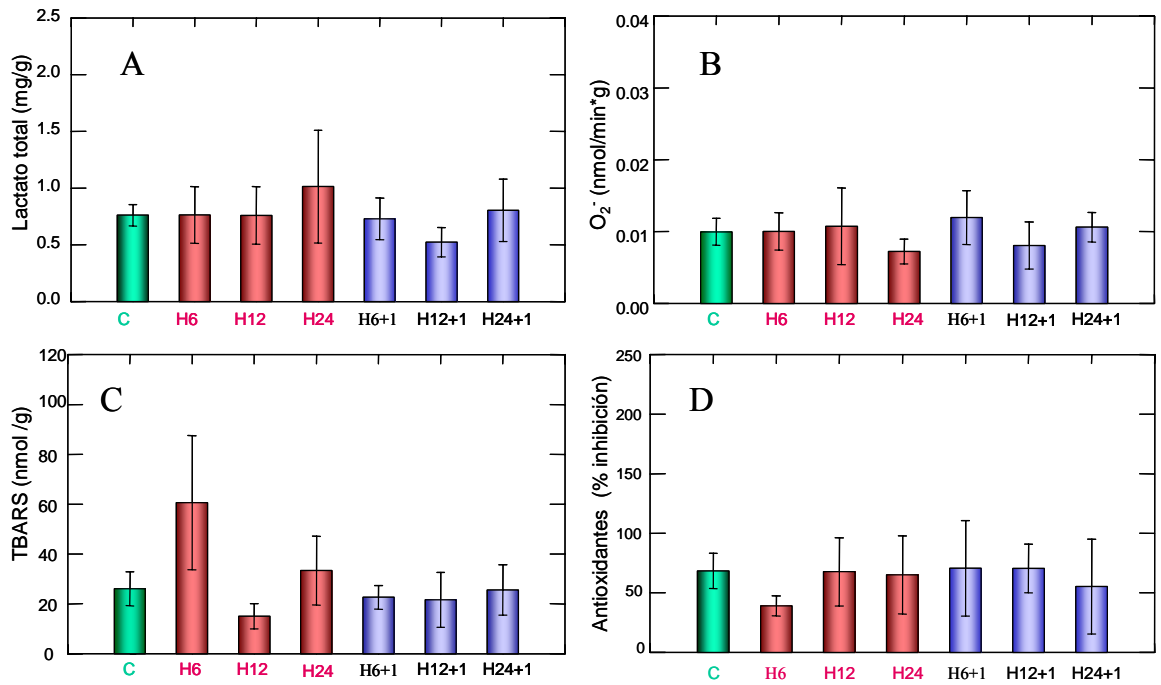


Figura 5. Niveles de A) lactato total, B) radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total en músculo de camarón blanco expuesto a condiciones control (C), hipoxia 6 (H6), 12 (H12) y 24 (H24) horas, e hipoxia más 1 hora de reoxigenación (H6+1, H12+1 y H24+1 respectivamente). Los datos se presentan como media ± error estándar.

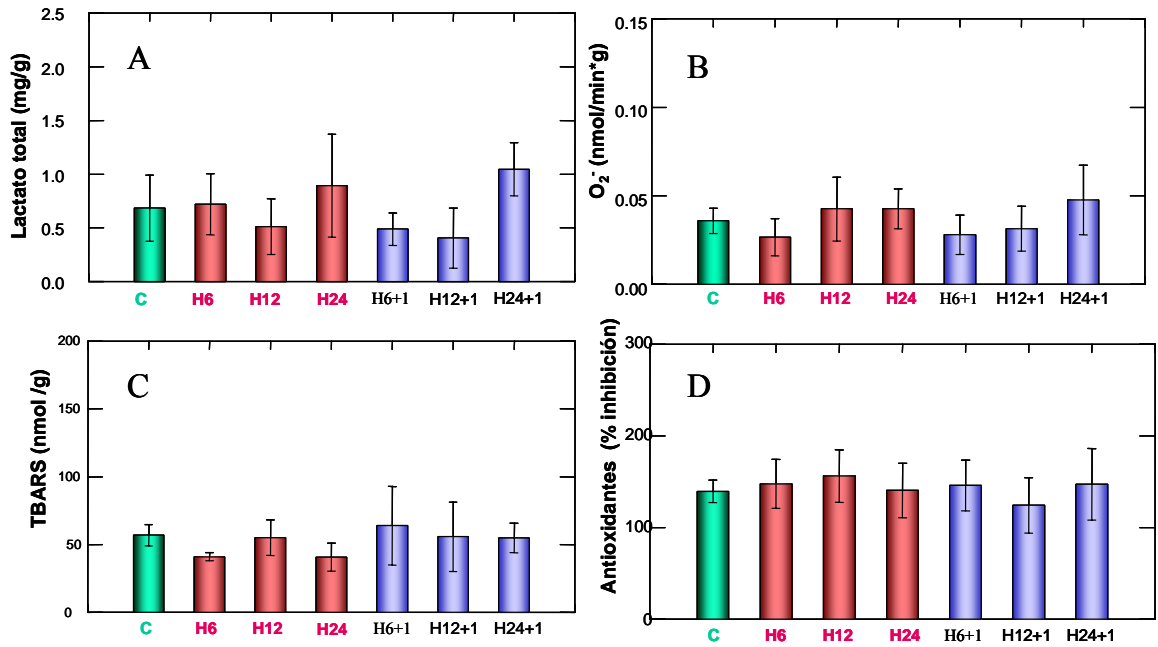


Figura 6. Niveles de A) lactato total, B) radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total en branquias de camarón blanco expuesto a condiciones control (C), hipoxia 6 (H6), 12 (H12) y 24 (H24) horas, e hipoxia más 1 hora de reoxigenación (H6+1, H12+1 y H24+1 respectivamente). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar.



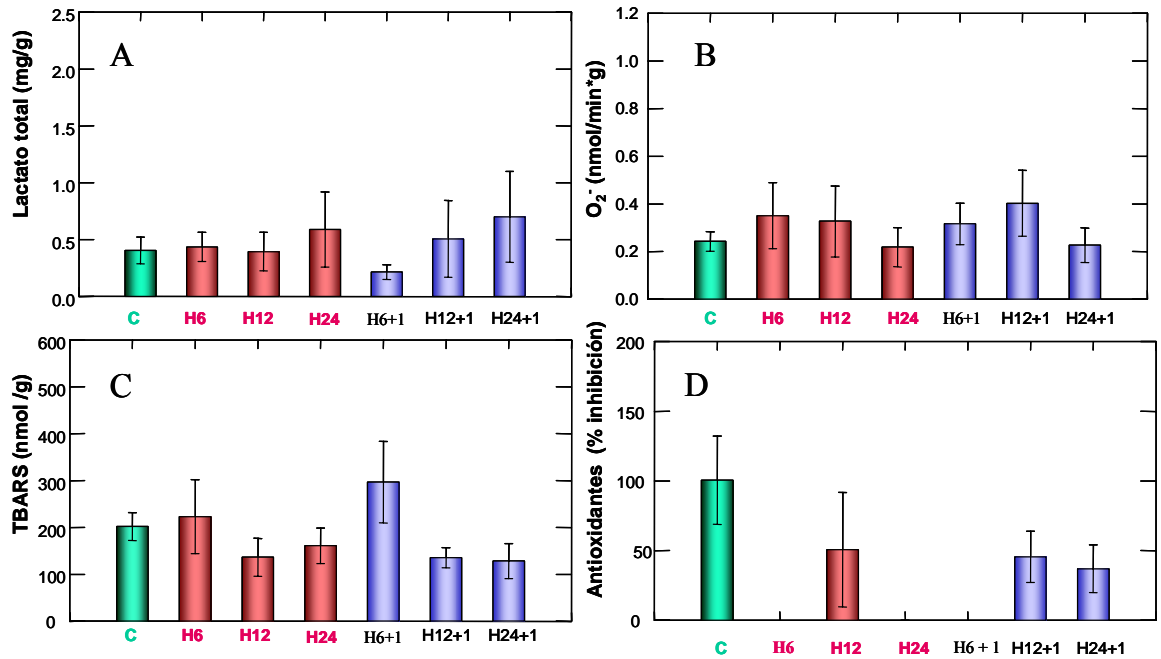


Figura 7. Niveles de A) lactato total, B) radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total en hepatopáncreas de camarón blanco expuesto a condiciones control (C), hipoxia 6 (H6), 12 (H12) y 24 (H24) horas, e hipoxia más 1 hora de reoxigenación (H6+1, H12+1 y H24+1 respectivamente). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar.

## SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL: Exposición a reoxigenación.

### COMPARACIÓN ENTRE TEJIDOS

En los tejidos de los camarones mantenidos bajo condiciones control ( $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups) en esta etapa experimental, el músculo presentó una concentración significativamente mas alta ( $p < 0.05$ ) de lactato total, en comparación con las branquias y el hepatopáncreas (figura 8A y tabla 5). En el hepatopáncreas se encontraron diferencias significativamente mas altas ( $p < 0.05$ ) en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y TBARS, al compararlos con los obtenidos en branquias y músculo (figura 8B y C). Por otra parte, las branquias presentaron diferencias significativamente mas altas ( $p < 0.05$ ) de capacidad antioxidante total en comparación con el músculo y el hepatopáncreas (figura 8D).

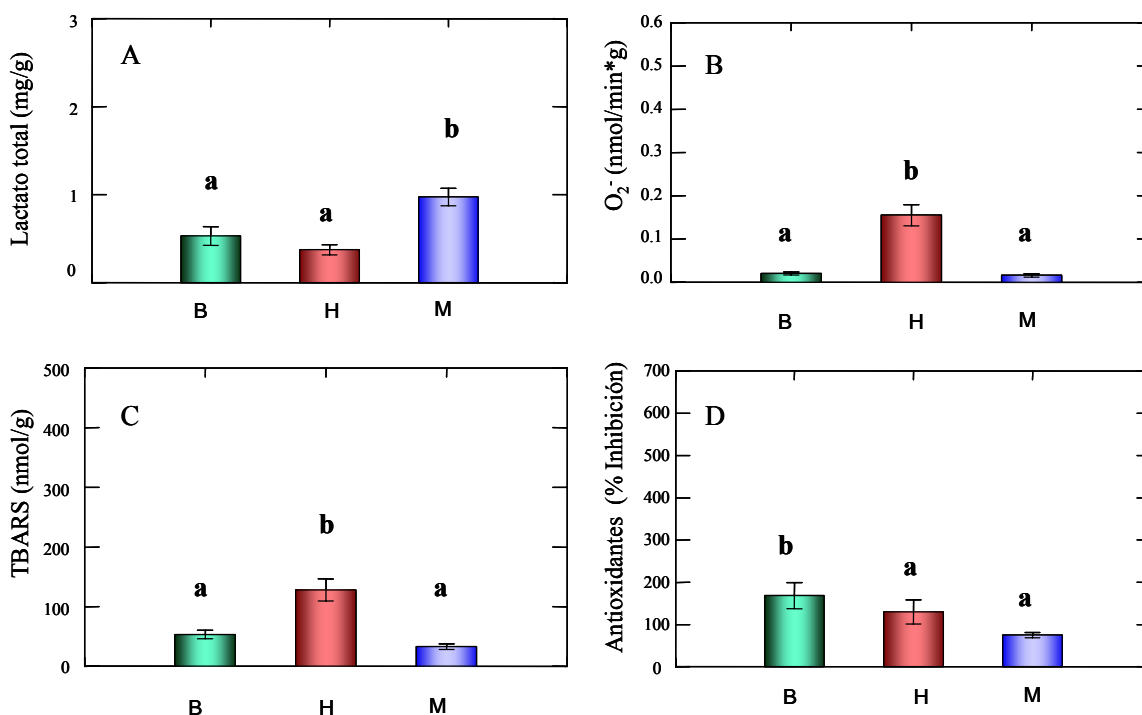


Figura 8. Metabolismo oxidativo en los tejidos de camarón blanco bajo condiciones control. B = Branquias, H = Hepatopáncreas, M = Músculo, O<sub>2</sub><sup>-</sup> = producción de radical superóxido, TBARS = Peroxidación de lípidos. Letras diferentes presentan diferencias significativas P < 0.05

## CONTROL

No se encontraron diferencias en las determinaciones de lactato total, producción de  $O_2^-$ , TBARS y capacidad antioxidante total, en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas de los camarones bajo condiciones controladas ( $5.95 \pm 0.06$  mg  $O_2/L$ ,  $24.90 \pm 0.10$  °C y  $37.78 \pm 0.10$  ups) (figura 9, 10, 11 y tablas 6, 7, 8). Se integró la información de los tratamientos bajo condiciones controladas, con la finalidad de compararlos con el grupo experimental de reoxigenación.

## HIPOXIA

En la segunda fase experimental. No se encontraron diferencias debido al tiempo de exposición a hipoxia en las determinaciones de lactato total, producción de  $O_2^-$ , TBARS y capacidad antioxidante total, en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas (figura 9, 10, 11 y tablas 6, 7, 8). Se integró la información de los tratamientos bajo condiciones de hipoxia, con la finalidad de compararlos con el grupo experimental de reoxigenación.

## REOXIGENACIÓN

### MÚSCULO

**Lactato total.** Los resultados obtenidos en músculo de camarón en la segunda fase experimental (exposición a reoxigenación) se presentan en la figura 9A y en la tabla 6. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (control, hipoxia, y reoxigenación).

**Producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ).** Se encontraron diferencias significativas en el músculo de los organismos expuestos a 24 horas de hipoxia más 2 horas de reoxigenación; los cuales presentaron una mayor producción de  $O_2^-$  ( $p= 0.0005$ ), en comparación con los demás grupos (control, hipoxia, y reoxigenación 1, 3, 4, 5 y 6 horas) (figura 9B y tabla 6).

**Peroxidación de lípidos (TBARS).** Se encontró que los organismos mantenidos durante 24 horas de hipoxia más 2 horas de reoxigenación presentaron menores niveles de TBARS; y que estos presentaron una tendencia no significativa a incrementarse en los organismos expuestos a 5 horas de reoxigenación ( $p = 0.105$ ) (figura 9C y tabla 6).

**Capacidad antioxidante total.** En la actividad antioxidante se encontró que los organismos expuestos a 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación presentaron menor capacidad antioxidante que los organismos mantenidos bajo condiciones control e hipoxia ( $p = 0.018, 0.003$ , respectivamente), también presentaron diferencias significativas con los mantenidos a 2 y 3 horas de reoxigenación ( $p = 0.001, 0.038$ , respectivamente). También se encontró que los organismos expuestos a 2 horas de reoxigenación presentaron la mayor actividad antioxidante, y que ésta comienza a disminuir a partir de las 3 horas de reoxigenación; así la capacidad antioxidante a las 5 horas de reoxigenación fue significativamente menor que aquella registrada a las 2 horas de reoxigenación ( $p = 0.037$ ) (figura 9D y tabla 6).

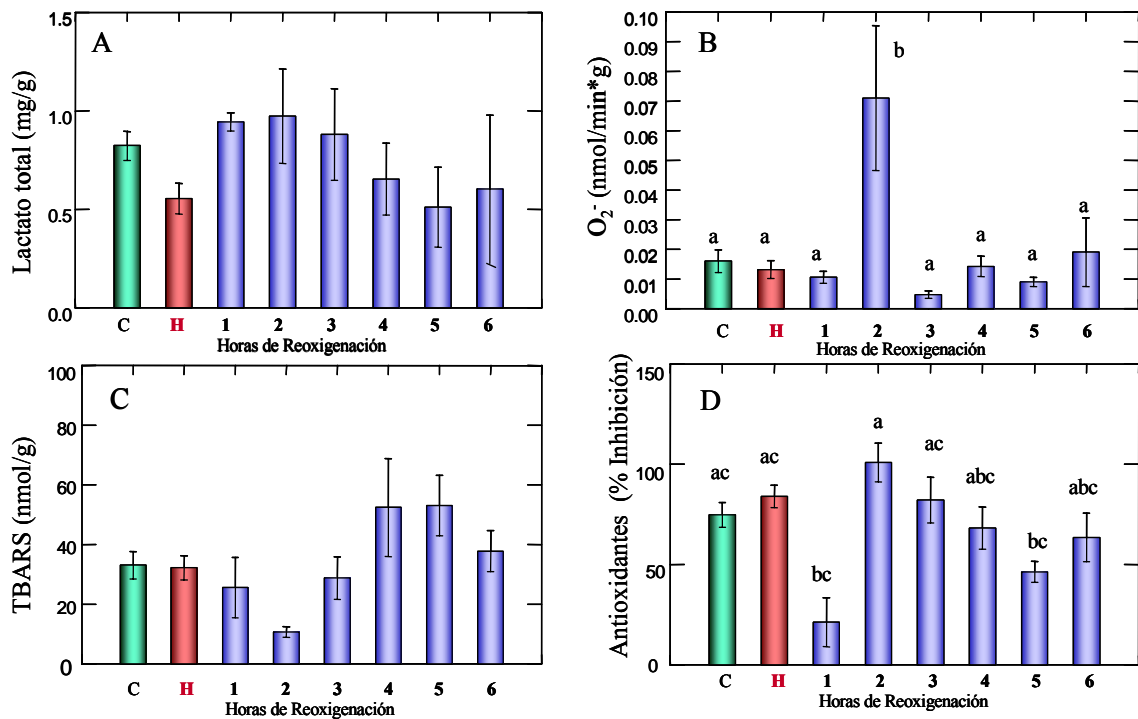


Figura 9. Niveles de A) lactato total, B) radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) capacidad antioxidante total en músculo de camarón blanco, expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. C = control 24 horas, H = 24 horas de hipoxia, 1 – 6 = Horas de oxigenación. Los datos se presentan como media ± error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos, P < 0.05.

## **BRANQUIAS**

**Lactato total.** No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (control, hipoxia e hipoxia 24 horas más 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de reoxigenación) (figura 10A y tabla 7) (anexo).

**Producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ).** No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (control, hipoxia e hipoxia 24 horas más 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas de reoxigenación). Sin embargo, se encontró una tendencia ( $p = 0.1$ ) en los organismos expuestos a 1 hora de reoxigenación a presentar mayor producción de  $O_2^-$  en comparación con los organismos mantenidos bajo condiciones control. También se observó una tendencia ( $p = 0.079$ ) en los organismos expuestos a 3 horas de reoxigenación a presentar menor producción de  $O_2^-$  que los organismos expuestos a 1 hora de reoxigenación (figura 10B y tabla 7).

**Peroxidación de lípidos (TBARS).** No se encontraron diferencias significativas en la TBARS en en los diferentes grupos experimentales (figura 10 C y tabla 7).

**Capacidad antioxidante total.** No se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre los organismos mantenidos en los diferentes grupos experimentales (figura 10 D y, tabla 7).

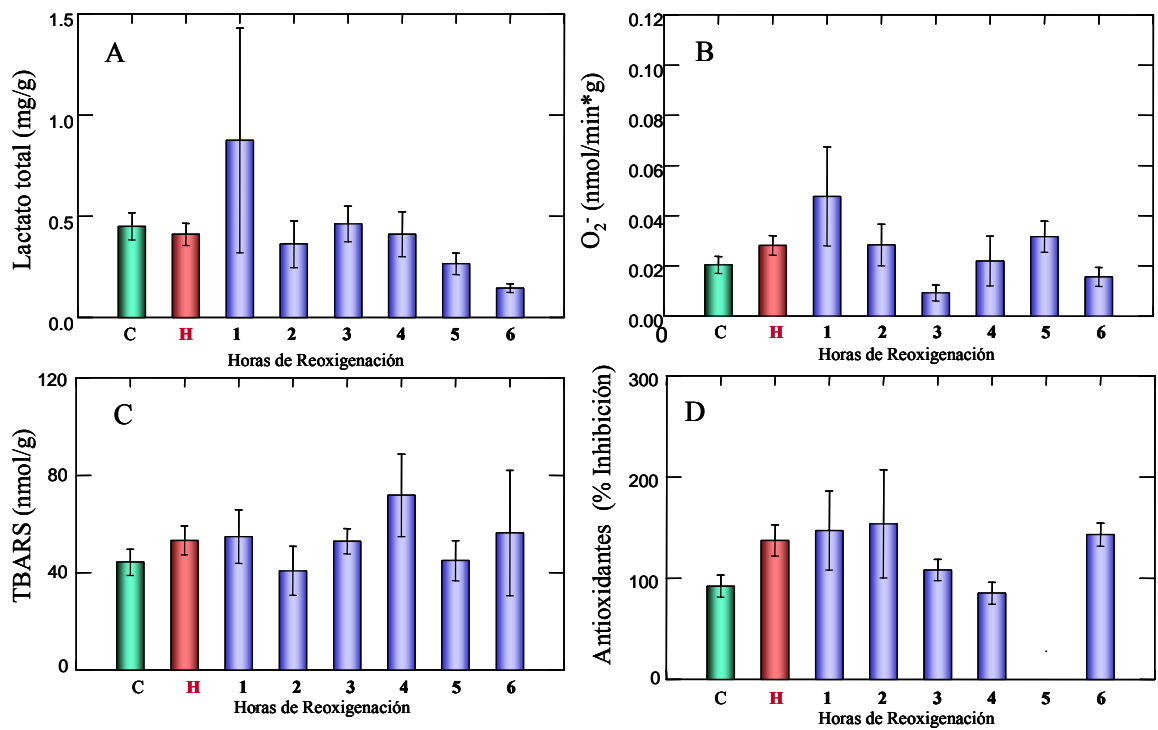


Figura 10. Niveles de A) lactato total, B) radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) antioxidantes totales en branquias de camarón blanco, expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. C = control 24 horas, H = 24 horas de hipoxia, 1 – 6 = Horas de oxigenación. Los datos se presentan como media ± error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos, P < 0.05.

## HEPATOPÁNCREAS

**Lactato total.** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Solo se identificó que los camarones expuestos a 1 hora de reoxigenación presentaron mayor concentración de lactato total, que los expuestos a 4 horas de reoxigenación (figura 11A y tabla 8).

**Producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ).** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Solo se encontró mayor producción de  $O_2^-$  en los organismos expuestos a 1 hora de reoxigenación en comparación con los organismos expuestos a 2 horas de reoxigenación ( $p=0.020$ ; figura 11B y tabla 8) (anexo). Se encontró que los organismos mantenidos en condiciones control presentaron una tendencia ( $p = 0.067$ ) a menor producción de  $O_2^-$  al compararlos con el grupo expuesto a 1 hora de reoxigenación.

**Peroxidación de lípidos (TBARS).** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (figura 11C y tabla 8).

**Capacidad antioxidante total.** No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (control, hipoxia y reoxigenación, figura 9D y tabla 8).

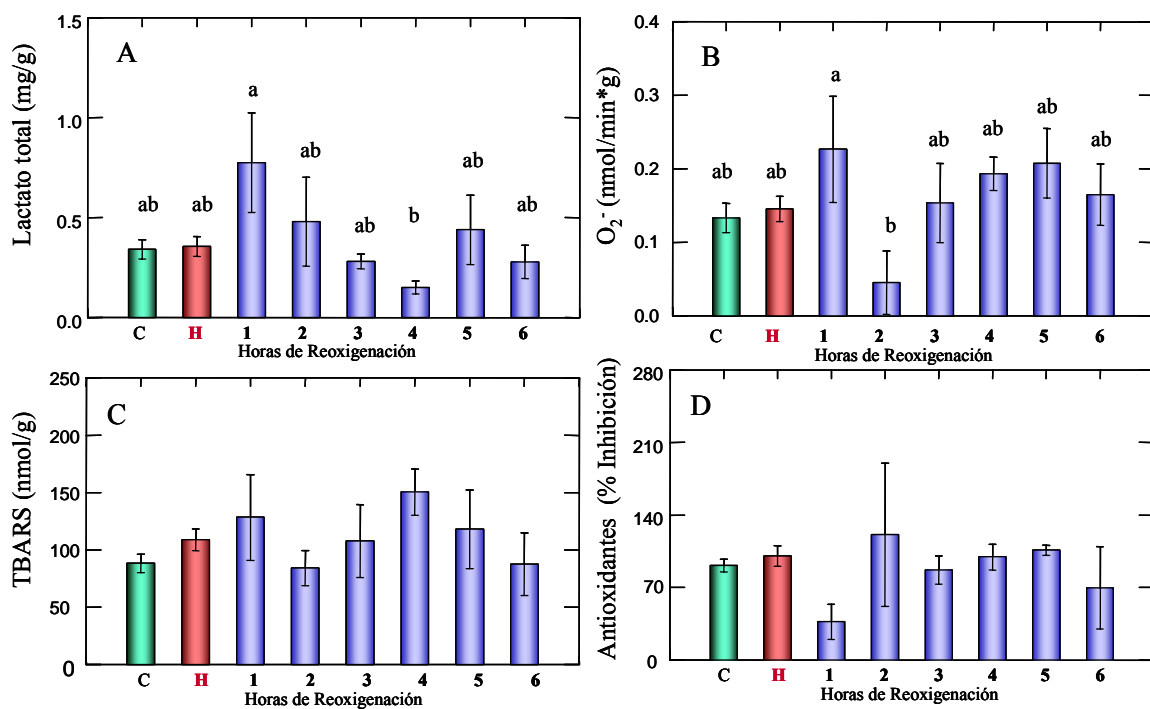


Figura 11. Niveles de A) lactato total, B) radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), C) peroxidación de lípidos (TBARS) y D) antioxidantes totales en hepatopáncreas de camarón blanco, expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. C = control 24 horas, H = 24 horas de hipoxia, 1 – 6 = Horas de oxigenación. Los datos se presentan como media ± error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos, P < 0.05.



## DISCUSIÓN

Los organismos vivos en su medio natural, están constantemente expuestos a daño oxidativo. Este daño es generado por parámetros ambientales, como la contaminación, exposición a luz ultravioleta (UV) y humo del cigarrillo. Sin embargo, también es el resultado natural del metabolismo aeróbico, a partir del cual se generan, como productos secundarios, varias moléculas altamente reactivas que actúan como oxidantes. Algunas de estas moléculas reactivas son fisiológicamente relevantes, e incluso necesarias para la vida, pero también pueden ser dañinas si se presentan en exceso (Fridovich, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000). El estrés oxidativo resulta de un desbalance entre la producción EROs y las defensas antioxidantes, lo que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que pueden provocar un deterioro o muerte celular (Sies, 1991).

Las exposiciones a hipoxia ambiental y reoxigenación subsiguiente son factores importantes que se presentan en las estanquerías de cultivo de camarón, a menudo propiciadas por el manejo inadecuado del alimento, sistemas de aeración, alta densidad, y comúnmente por el alto consumo de oxígeno provocado por la producción primaria presente en el estanque (BANCOMEXT, 1999). Se ha reportado mucha información sobre la respuesta que presentan los crustáceos cuando se presentan fenómenos de hipoxia (Carreño-León, 2000; Cheng *et al.*, 2003); pero se tiene poca información sobre el metabolismo y los efectos de las EROs que se pudieran producir en los cultivos de camarón en respuesta a hipoxia y reoxigenación.

El entendimiento de la respuesta que presenta el camarón blanco a condiciones que inducen estrés oxidativo es de gran importancia en los sistemas de cultivo; particularmente, conocer los niveles de EROs y del daño oxidativo que se producen durante una exposición a hipoxia y reoxigenación subsiguiente permitiría sugerir a los acuacultores estrategias para proteger a los camarones de cultivo. Se ha documentado que una exposición a hipoxia y anoxia está ligada a mortalidades masivas de organismos en cultivo y que una prevención de estos problemas pueden llevar a una buena calidad del producto de cultivo (Wu, 2002).

## **PRIMERA FASE EXPERIMENTAL: EXPOSICIÓN A HIPOXIA**

### **Lactato total**

Los invertebrados marinos responden a condiciones de hipoxia mediante el uso de vías metabólicas alternas, donde el lactato es el producto final del metabolismo anaerobio (Hochachka *et al.*, 1992). En este estudio no se encontraron diferencias en la concentración de lactato total en músculo, branquias y hepatopáncreas entre los grupos experimentales control, hipoxia y reoxigenación (figura 5). No se encontró efecto en el tiempo de exposición a hipoxia (6, 12 y 24 horas) en músculo, branquias y hepatopáncreas.

En los experimentos efectuados en este estudio bajo condiciones controladas ( $5.95 \pm 0.06$  mg O<sub>2</sub>/L) se encontraron concentraciones promedio de lactato de  $0.76 \pm 0.086$  mg / g en músculo,  $0.684 \pm 0.282$  mg / g en branquias, y  $0.406 \pm 114$  mg / g en hepatopáncreas. Los resultados reportados en este estudio para músculo concuerdan con los reportados por Carreño-León (2000) en músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) bajo condiciones de normoxia, quien encontró 0.85 mg de lactato / g de tejido. Morán-Morales (2003) reportó una concentración de 0.85 mg de lactato / g de tejido en músculo de camarón café (*L. californiensis*) bajo condiciones normóxicas. Los niveles de lactato total en músculo reportados por Carreño-León (2000), Morán-Morales (2003), y los de este trabajo fueron menores que los reportados en músculo de camarón blanco (*L. vannamei*) en condiciones de normoxia por Racotta y Palacios (1998), y Racotta y Hernández-Herrera (2000), quienes encontraron 1.4 mg de lactato / g de tejido y 1.28 mg de lactato / g de tejido, respectivamente. Las condiciones ambientales bajo las cuales fueron mantenidos los organismos en los trabajos de Carreño-León (2000) y Morán-Morales (2003) fueron similares a los de este trabajo (camarones de  $12 \pm 4$  g de peso, salinidad de  $37 \pm 2$  ups, y temperatura de  $25 \pm 1$  °C), mientras que los camarones utilizados por Racotta y Palacios (1998) y Racotta y Hernández-Herrera (2000) tenían un peso de  $12 \pm 2$  g y fueron mantenidos a una salinidad de 39 ups y temperatura de  $28 \pm 1$  °C. Estos resultados confirman que los organismos responden a cambios en salinidad y temperatura, y que éstos propician modificaciones en su actividad metabólica en músculo (Bridges y Brand, 1980; Herreid II, 1980; Fandrey, 1995; Wu, 2002).

Racotta y Hernández-Herrera (2000) reportaron la concentración de 0.26 mg de lactato / g de tejido en hepatopáncreas de camarón blanco (*L. vannamei*) en condiciones de normoxia, y Morán-Morales (2003) reportó en camarón café (*L. californiensis*) bajo condiciones basales la concentración

de 0.39 mg de lactato / g de tejido. Estos datos concuerdan con los registrados en este trabajo; lo cual pone de manifiesto que las condiciones experimentales (salinidad y temperatura) en que se mantuvieron los organismos en los estudios comparados no afectan las determinaciones de lactato en hepatopáncreas.

Los niveles de lactato en músculo ( $1.013 \pm 0.415$  mg / g) en los camarones mantenidos bajo condiciones de hipoxia ( $1.00 \pm 0.05$  mg O<sub>2</sub>/L) reportados en este estudio concuerdan con los obtenidos por Racotta y Palacios (1998) en músculo de camarón blanco expuesto a hipoxia (1.5 – 2.5 mg O<sub>2</sub>/L) durante 3 días (1.7 mg de lactato / g de tejido), este valor no cambió cuando el período de exposición se incrementó a 15 días. Morán-Morales (2003) determinó una concentración de 0.72 mg de lactato / g de tejido en hepatopáncreas de camarón café mantenido bajo condiciones de hipoxia (1 mg de O<sub>2</sub>/L), la cual coincidió con el valor registrado en este trabajo ( $0.359 \pm 0.289$  mg / g). Se ha demostrado que el valor crítico de O<sub>2</sub> para los camarones peneidos es de 0.2 mg O<sub>2</sub> / L (Allan y Maguire, 1991). Nicovita (2001) sugiere que el nivel de hipoxia (1 mg de O<sub>2</sub>/L), es letal en exposición prolongada, sin embargo, no reporta el tiempo de exposición requerido para inducir la mortalidad. Bridges y Brand (1980) señalan que los invertebrados marinos enfrentan condiciones frecuentes de hipoxia en su ambiente natural, y que están fisiológicamente adaptados para remover el lactato acumulado cuando las condiciones regresan a niveles normales de concentración de O<sub>2</sub>. Los resultados de este trabajo, en combinación con lo reportado en la literatura sugiere que el camarón blanco, *L. vannamei*, está capacitado para soportar niveles de hipoxia de 1 mg O<sub>2</sub>/L durante el tiempo de exposición (6, 12 y 24 horas) en que fueron mantenidos sin que se modifique los niveles de lactato en músculo, branquias y hepatopáncreas.

### **Radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

No se encontraron diferencias significativas en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en músculo, branquias y hepatopáncreas en camarón blanco entre los diferentes grupos experimentales (control, hipoxia y reoxigenación), ni entre los tratamientos de hipoxia a 6, 12 y 24 horas.

Los tejidos (músculo, branquias y hepatopáncreas) del camarón blanco (*L. vannamei*) en condiciones control, presentaron una producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de  $0.025 \pm 0.005$  nmol / min\* g en músculo,  $0.033 \pm 0.005$  nmol / min\* g en branquias y  $0.518 \pm 0.046$  nmol / min\* g en hepatopáncreas. Estos niveles no concuerdan con los reportados por Zenteno-Savín *et al.* (2004) para el langostino de agua

dulce, *C. quadricarinatus*, que presentó niveles mas altos en todos los tejidos ( $0.163 \pm 0.026$  nmol / min\* g en músculo,  $0.147 \pm 0.137$  nmol / min\* g en branquias y  $2.784 \pm 0.238$  nmol / min\* g en hepatopáncreas). Es posible que las diferencias en la producción basal de  $O_2^-$  entre estas especies podrían deberse a que viven en diferentes hábitats; los camarones son marinos, mientras que el langostino viven en agua dulce.

No se encontró efecto en los niveles de  $O_2^-$  en los camarones expuestos a hipoxia en músculo ( $0.011 \pm 0.005$  nmol / min\* g), branquias ( $0.051 \pm 0.016$  nmol / min\* g), y hepatopáncreas ( $0.355 \pm 0.123$  nmol / min\* g). Tampoco se encontraron efectos en los organismos expuestos a 1 hora de reoxigenación, en donde se presentaron niveles de  $O_2^-$  en músculo de  $0.011 \pm 0.003$  nmol / min\* g, en branquias de  $0.048 \pm 0.018$  nmol / min\* g, y en hepatopáncreas de  $0.393 \pm 0.106$  nmol / min\* g. La producción de  $O_2^-$  puede tomarse como un índice de cuántos radicales libres se generan cuando se presentan estímulos que modifiquen la actividad metabólica de las mitocondrias; entre estos se pueden mencionar, incorporación abrupta de  $O_2$ , aumento en la presencia de microorganismos o contaminantes (Martínez -Cayuela, M. 1998; Zenteno- Savin T..2002). En este sentido, una reoxigenación después de un periodo de hipoxia o anoxia resulta en alta producción de  $O_2^-$  y la presencia de este radical promueve la formación de otros radicales (Pannuncio y Storey, 1998; Hermes-Lima *et al.*, 1998; Gil del Valle *et al.*, 1999; Zenteno-Savín, 2002).

Los resultados de este estudio sugieren que el tiempo de exposición a hipoxia moderada (6, 12 y 24 horas) no afecta la producción de  $O_2^-$ , quizás porque bajo estas condiciones no se modifica la actividad metabólica de las mitocondrias del camarón blanco.

### **Peroxidación de lípidos (TBARS)**

La peroxidación de lípidos se considera un proceso muy importante en la pérdida de la función celular durante situaciones de estrés oxidativo. La peroxidación de lípidos ocurre como resultado de la actividad de los radicales libres sobre grasas, muy específicamente sobre ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); los radicales provocan la abstracción de un hidrógeno, formando hidroperóxidos que pueden ser medidos (Pérez y Pérez, 2000).

En la exposición de camarón blanco a condiciones de hipoxia no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (control, hipoxia y reoxigenación). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (6, 12 y 24 horas). Los niveles de TBARS

en músculo (control  $25.04 \pm 6.22$  nmol / g), branquias (control  $56.48 \pm 6.68$  nmol / g) concuerdan con los reportados por Zenteno-Savín *et al.* (2004) en músculo y branquias del langostino, *Cherax quadricarinatus* bajo condiciones control (músculo  $25.10 \pm 5.0$  nmol / g y branquias  $31.30 \pm 4.70$  nmol / g.). En hepatopáncreas (control  $198.24 \pm 25.19$  nmol / g) se encontraron menores niveles de TBARS que los reportados por Zenteno-Savín *et al.* (2004) en hepatopáncreas ( $518.80 \pm 46.50$  nmol / g) bajo condiciones control. El hepatopáncreas de los crustáceos presenta cierta particularidad para la detoxificación, catabolismo de productos digeridos y una alta secreción de enzimas que participan en la digestión y absorción (Gibson y Barker, 1979). Quizá las diferencias en habitat y dieta entre el camarón blanco y el langostino ocasionen las diferencias en las concentraciones de TBARS entre estas especies.

Los resultados de este estudio sugieren que la exposición a hipoxia ( $1 \pm 0.05$  mg O<sub>2</sub>/L) por 6, 12 y 24 horas, no afecta la peroxidación de lípidos del camarón blanco. La presencia de O<sub>2</sub> promueve la formación de otros radicales (Gil del Valle *et al.*, 1999), y éstos causan daño a los lípidos, proteínas y ADN (Halliwell y Gutteridge, 2000). El que no se haya encontrado un efecto de la exposición a hipoxia sobre la producción de O<sub>2</sub><sup>·-</sup> en tejidos de camarón blanco, concuerda con lo observado en TBARS.

### **Capacidad antioxidante total.**

A partir de los resultados obtenidos en la exposición del camarón blanco a hipoxia no se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre los grupos experimentales (control, hipoxia y reoxigenación). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (6, 12 y 24 horas de hipoxia) en músculo, branquias y hepatopáncreas del camarón blanco. El estado antioxidante total refleja la condición del sistema de defensa celular contra los prooxidantes (EROs), y es utilizado como indicador de la protección contra el daño oxidativo. Pannunzio y Storey (1998) expusieron al caracol intermareal, *Littorina littorea*, a condiciones de anoxia y reoxigenación, y encontraron que el sistema de defensa antioxidante disminuye cuando se presentan condiciones de hipoxia y anoxia (disminuyen la SOD, catalasa y glutatión reductasa (GR)), pero también en la anoxia se activan antioxidantes de bajo peso molecular como glutatión reducido (GRH) y glutatión oxidado (GSSG); aparentemente estos efectos suceden de forma similar en varias especies de organismos marinos. Hermes- Lima *et al.* (1993 y 2001) en sus estudios sobre especies tolerantes a hipoxia (serpientes, peces dorados y sapo), encontraron incrementos en la actividad de enzimas antioxidantes y

en la concentración de pequeñas moléculas antioxidantes que funcionan como defensas ante la producción excesiva de EROs.

En este estudio, la producción de  $O_2^-$ , TBARS y capacidad antioxidante total no fueron afectados por el tiempo de exposición a hipoxia. Esto sugiere que el nivel de hipoxia ( $1 \pm 0.05$  mg  $O_2/L$ ) al que fueron mantenidos los camarones no afectó su metabolismo oxidativo. Se ha reportado que esta especie presenta niveles críticos de 0.2 mg  $O_2/L$  (Allan y Maguire, 1991), por lo tanto la concentración de  $O_2$  a la que fueron mantenidos los camarones en este estudio, estuvo dentro de los niveles tolerados por la especie.

### **Diferencias entre tejidos**

El metabolismo de un organismo depende de manera directa de la funcionalidad de los tejidos que lo componen. El patrón de respuesta encontrado en los tejidos de los camarones expuestos a experimentación en este estudio (control, hipoxia y reoxigenación) reflejó el comportamiento metabólico de cada tejido.

No se presentaron diferencias significativas en la determinación de lactato total (metabolismo anaerobio) entre los tejidos (músculo, branquias y hepatopáncreas) del camarón blanco (*L. vannamei*). El hepatopáncreas presentó altos niveles de  $O_2^-$  y de TBARS en todos los tratamientos experimentos (6, 12 y 24 horas), en comparación con los valores obtenidos para músculo y branquias. Los niveles de  $O_2^-$  y TBARS podrían estar relacionados con las funciones que realiza el hepatopáncreas, entre las que se encuentran: secreción de enzimas digestivas, metabolismo de carbohidratos y lípidos, digestión, absorción, y almacenamiento de reservas minerales (Barnes y Ruppert, 1996). En el caracol gasterópodo intermareal, (*L. littorea*) se encontró mayor peroxidación de lípidos, así como mayor concentración de antioxidantes de bajo peso molecular, en el hepatopáncreas en comparación con el músculo (Pannunzio y Storey, 1998). Las branquias presentaron mayor capacidad antioxidante total en comparación a lo determinado para músculo y hepatopáncreas. Los antioxidantes de bajo peso molecular se activan cuando se perciben niveles de estrés oxidativo (hipoxia y anoxia) (Pannunzio y Storey, 1998). Ansaldo *et al.* (2000), en trabajos realizados con peces del ártico, encontraron mayor actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en las branquias que en los tejidos músculo, hígado y riñón.

En resumen, no se encontró efecto por el tiempo de exposición a hipoxia al que fueron expuestos los camarones blancos (*L. vannamei*). No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales (control, hipoxia y reoxigenación), ni entre los tratamientos (6, 12 y 24 horas), en la utilización del metabolismo anaerobio (lactato total), producción de EROs ( $O_2^-$ ), daño oxidativo (peroxidación de lípidos, TBARS), y capacidad antioxidante total (% de inhibición). Esto confirma que el camarón blanco soporta concentraciones de 1 mg de  $O_2/L$ , ya que está muy por encima del punto crítico que se ha reportado para esta especie.

## **SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL: REOXIGENACIÓN**

### **Lactato total**

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de lactato total en músculo y branquias de los camarones mantenidos bajo condiciones control, de hipoxia y de reoxigenación (figuras 9A y 10A). Sin embargo, en el hepatopáncreas se encontró un efecto por el tiempo de exposición a reoxigenación; específicamente, los niveles de lactato en los camarones que fueron mantenidos a 1 hora de reoxigenación ( $0.907 \pm 0.221$  mg de lactato / g de tejido) fueron significativamente mayores que los de 4 horas de reoxigenación ( $0.152 \pm 0.029$  mg de lactato / g de tejido) (figura 11A). Henry *et al.* (1994) reportaron en la jaiba, *Callinectes sapidus* expuesta a ejercicio exhaustivo (hipoxia metabólica) durante 20 min, un incremento en la concentración de lactato en el hepatopáncreas; ésta concentración se siguió incrementando hasta 1 hora de reoxigenación; después de este tiempo el lactato comenzó a disminuir hasta las 4 horas de reoxigenación. Así, el patrón que presentó este tejido en las 2 especies de crustáceos (camarón y jaiba) podría estar relacionado con los procesos de digestión, así como la utilización de los productos de reserva (Gibson y Barker, 1979). Respecto a lo registrado en el músculo y las branquias, se podría sugerir que los camarones mantenidos bajo las condiciones experimentales en este trabajo no requieren hacer uso del metabolismo anaerobio dado que no presentaron diferencias en la concentración de lactato, y que el período de reoxigenación (1 – 6 horas) después de una hipoxia moderada ( $1 \pm 0.05$  mg O<sub>2</sub>/L por 24 horas) no afectó las concentraciones de lactato en estos tejidos.

Muchos crustáceos decápodos están adaptados para tolerar eventos severos de hipoxia y anoxia, con altos niveles de sobrevivencia, aun cuando las condiciones duren muchas horas o hasta días (Hochachka *et al.*, 1992). Lushchak *et al.* (2001) mencionan que especies de peces como el doradito, *Carassius auratus*, pueden sobrevivir a periodos de anoxia durante horas y hasta días; estos peces han desarrollado un mecanismo que regula y previene la demanda de energía reduciéndola bajo condiciones de anoxia por medio de procesos de depresión metabólica. Esta adaptación metabólica incluye la presencia de altas reservas de glucógeno en cerebro e hígado, y un sistema de metabolismo de lactato en músculo vía reducción a etanol y bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Lushchak *et al.*, 2001). Zou *et al.* (1996) reportaron que en el cultivo del cangrejo, *Eriocheir sinens*, es frecuente la falta de O<sub>2</sub> (hipoxia) y que el aumento en el consumo de O<sub>2</sub> observado durante el periodo de reoxigenación es interpretado generalmente como una necesidad para mantener las demandas energéticas que se incrementan para descomponer y eliminar los productos oxidados.



### **Radical superóxido ( $O_2^-$ )**

No se observó efecto de reoxigenación en la producción de  $O_2^-$  en las branquias del camarón blanco. Se presentaron efectos marcados en la producción de  $O_2^-$  en el músculo y hepatopáncreas expuestos a 1 y 2 horas de reoxigenación. Estos resultados son clara evidencia de que los camarones se vieron afectados durante las 2 primeras horas de reoxigenación. Lo anterior concuerda con lo reportado por Campa *et al.* (2002) en hemocitos del camarón blanco (*L. vannamei*), donde la generación de  $O_2^-$  se incrementó a 1.5 veces a las 24 horas y 2.0 veces a las 48 horas después de una inmersión en la solución  $\beta$ -glucano polisacárido sulfatado y con la bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*, con respecto al grupo control. En el músculo, la alta producción de  $O_2^-$  puede deberse al alto contenido de mitocondrias, donde los procesos de reoxigenación podrían estar promoviendo una alta producción de  $O_2^-$  (Gil del Valle *et al.*, 1999).

### **Peroxidación de lípidos (TBARS)**

En los tejidos (músculo, branquias y hepatopáncreas) del camarón blanco no se encontraron efectos en los niveles de TBARS por el tiempo de reoxigenación. Sin embargo, en el músculo se encontraron niveles bajos de TBARS en los organismos expuestos a 2 horas de reoxigenación, en comparación con los niveles obtenidos en los camarones expuestos a 5 horas de reoxigenación. Información que concuerdan con los reportados por Lushchak *et al.* (2001), quienes reportaron en el músculo del pez, *C.s auratus*, bajos niveles de peroxidación de lípidos (dienos conjugados) cuando fueron expuestos a 1 hora de reoxigenación en comparación a los encontrados a las 14 horas de reoxigenación.

Los camarones expuestos a 2 horas de reoxigenación presentaron niveles bajos de TBARS y niveles altos del radical  $O_2^-$  en músculo y, en los camarones expuestos a 5 horas de reoxigenación se encontraron mayores niveles de TBARS (no significativos,  $p=0.105$ ). Dado que la alta producción de  $O_2^-$  a las 2 horas de reoxigenación aparentemente es un indicador de daño al músculo, lo cual no se reflejó en los niveles de TBARS, ya que en este tiempo fueron bajos. Sin embargo, el daño del músculo se reflejó hasta las 5 horas de reoxigenación, ya que se alcanzaron valores importantes de TBARS. Se ha documentado que a mayor producción de  $O_2^-$ , mayor debería de ser el daño que se produce en las membranas celulares (TBARS), (Gil del Valle *et al.*, 1999). El daño producido por  $O_2^-$  y por otras EROs en los organismos está relacionado con muchas enfermedades, tales como arteriosclerosis, embolia y cáncer; se acumula con la edad, y puede estar relacionado con la producción de neurotoxinas

en crustáceos de valor comercial (Poeggeler *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 1995; Hermes- Lima *et al.*, 1998).

### **Capacidad antioxidante total**

En las branquias y el hepatopáncreas del camarón blanco no se encontró efecto del tiempo de exposición a reoxigenación en la capacidad antioxidante total. En el músculo de los organismos expuesto a 1 hora de reoxigenación se determinó menor capacidad antioxidante en comparación a los grupos experimentales, control, hipoxia y 2 horas de reoxigenación. También se observó que los organismos mantenidos a 2 horas de reoxigenación presentaron mayor capacidad antioxidante en comparación a los mantenidos a 5 horas de reoxigenación. Se ha reportado que cuando se someten a reoxigenación organismos que han estado en condiciones de anoxia disminuyen los niveles de antioxidantes de bajo peso molecular (GRH y GSSG) y se activan enzimas antioxidantes, como SOD, catalasa, glutatión-S-transferasa (GST) y GR (Wilmore y Storey, 1997; Pannunzio y Storey, 1998; Hermes-Lima *et al.*, 1998, 2001; Lushchak *et al.* 2001).

Quizá la alta capacidad antioxidante observada en el músculo a 2 horas de reoxigenación contribuyó a neutralizar el daño que pudieran haber producido los radicales  $O_2^-$  que se presentaron en este tiempo, lo cual se confirma con los bajos niveles de TBARS registrados. También se encontró una disminución en la capacidad antioxidante total después de las 2 horas de reoxigenación siendo significativa en los organismos expuestos a 5 horas de reoxigenación ( $p=0.037$ ). Al mismo tiempo que los niveles de TBARS se incrementaron (no significativos,  $p=0.105$ ) en los organismos expuestos a 5 horas de reoxigenación. Lo anterior podría sugerir que el daño oxidativo producido por los radicales libres ( $O_2^-$ ) afectan el metabolismo del músculo de los camarones expuestos a reoxigenación.

El hepatopáncreas presentó mayores niveles de lactato total y radical superóxido ( $O_2^-$ ) en los camarones expuestos a 1 hora de reoxigenación. Sin embargo, no se encontró efecto en la peroxidación de lípidos (TBARS) ni en la capacidad antioxidante total. Estos resultados podrían estar sugiriendo que en el hepatopáncreas, los altos niveles de lactato pudieran estar actuando como un antioxidante y que los radicales  $O_2^-$  podrían estar relacionados con los procesos de defensa celular como lo han señalado Groussard *et al.* (2000) y Halliwell y Gutteridge (2000).

## Comparación entre tejidos

En el músculo de camarón blanco mantenido bajo condiciones control, se encontró mayor concentración de lactato total en comparación con lo encontrado en branquias y hepatopáncreas. Los organismos tienden a utilizar aun más el oxígeno durante procesos estresantes, como amenazas externas (depredación), cambios ambientales adversos (hipoxia, anoxia, temperatura, salinidad, etc.), o por captura o manipulación (Gade, 1984). Cuando el suplemento de  $O_2$  es limitado, los crustáceos utilizan la ruta metabólica anaeróbica para obtener energía resultando en producción de lactato, el cual es acumulado en el músculo y hemolinfa (Gade, 1984; Van Aard, 1988). En experimentos bajo condiciones de hipoxia y anoxia se han encontrado altas concentraciones de lactato en el músculo de crustáceos, así como disminución evidente de glucógeno, lo cual sugiere que éste último es utilizado como sustrato durante el metabolismo anaerobio con producción de lactato (Zebe, 1982; Van Aardt y Wolmarans, 1987; Van Aardt, 1988), y cuando se presenta a una reoxigenación los niveles de lactato comienzan a disminuir (Van Aardt y Wolmarans, 1987; Van Aardt, 1988). El lactato en músculo funciona como un intermediario metabólico que aumenta cuando se presentan fenómenos de anoxia e hipoxia, también incrementa durante el ejercicio de alta intensidad, como consecuencia de la elevada actividad glucolítica. Debido a su masa, el músculo tiene un papel fundamental en la regulación del lactato, como principal productor y consumidor de éste en el cuerpo.

Los niveles encontrados en este estudio de  $O_2^-$  y TBARS en hepatopáncreas, mayores que en branquias y músculo, ponen de manifiesto la alta funcionalidad que presenta este tejido en procesos de detoxificación, catabolismo de productos digeridos, secreción de enzimas que participan en la digestión, absorción y almacenamiento de reservas minerales (Gibson y Barker, 1979; Barnes y Ruppert, 1996). También se ha demostrado que en el hepatopáncreas de camarones producidos en laboratorio se presenta una mayor actividad de enzimas antioxidantes que en los camarones silvestres (Liñán-Cabello *et al.* 2003).

Las branquias presentaron mayor capacidad antioxidante total en comparación a lo determinado para músculo y hepatopáncreas. Las diferencias encontradas en la capacidad antioxidante entre los tejidos de camarón blanco, refleja una adaptación importante para evitar daño a las membranas celulares involucradas en la respiración por EROs mediante la capacidad de depurar las EROs, después de procesos de hipoxia y reoxigenación.

Durante el desarrollo de este trabajo, no se encontró diferencia entre tejidos en cuanto a la exposición a 6, 12 o 24 horas de hipoxia en los niveles de producción de  $O_2^-$ , TBARS y capacidad antioxidante total. La concentración de oxígeno utilizada durante este estudio en las exposiciones a hipoxia ( $1 \pm 0.05$  mg  $O_2/L$ ) está dentro del rango de tolerancia de esta especie. Dado que la concentración de oxígeno considerada como crítica para esta especie es de 0.2 mg  $O_2/L$  (Allan y Maguire, 1991).

Durante el desarrollo de la segunda fase experimental, se encontró que la reoxigenación afecta el metabolismo oxidativo del camarón blanco (*L. vannamei*), principalmente durante las 2 primeras horas de reoxigenación. Se encontró un mayor efecto de exposición a reoxigenación en los tejidos músculo y hepatopáncreas. Con lo anterior, se destaca que la reoxigenación después de una hipoxia moderada puede tener consecuencias directas en el metabolismo de los camarones, *L. vannamei* en cultivo.

## CONCLUSIONES

- Se encontraron diferencias entre los tejidos (músculo, branquias y hepatopáncreas) de los camarones mantenidos bajo condiciones control en los niveles de lactato total, producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total. Esto indica que los tejidos de camarón blanco presentan diferencias en el metabolismo oxidativo en condiciones basales.
- En este estudio no se encontró efecto en los tejidos (músculo, branquias y hepatopáncreas) de camarón blanco por exposición a hipoxia ( $1.0 \pm 0.05$  mg  $O_2/L$ ) en los niveles de lactato total, producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total. Esto confirma que el camarón blanco soporta concentraciones de 1 mg de  $O_2/L$ , ya que está muy por encima del punto crítico que se ha reportado para esta especie.
- Se encontró mayor producción de radical superóxido ( $O_2^-$ ) y capacidad antioxidante total en el músculo de los camarones expuestos a 2 horas de reoxigenación. Esta mayor capacidad antioxidante puede llegar a explicar los bajos niveles de peroxidación de lípidos (TBARS) observados a 2 horas de reoxigenación. Sin embargo, se observó que el nivel de peroxidación de lípidos (TBARS) se incrementó, mientras que disminuyó la capacidad antioxidante total en los camarones expuestos a 3, 4 y 5 horas de reoxigenación. Estos resultados sugieren que el daño producido por los radicales libres presentes a las 2 horas de reoxigenación es evidente en los camarones expuestos a 3, 4 y 5 horas de reoxigenación.
- El hepatopáncreas presentó mayores niveles de lactato total y radical superóxido ( $O_2^-$ ) en los camarones expuestos a 1 hora de reoxigenación. Sin embargo, no se encontró efecto en la peroxidación de lípidos (TBARS) ni en la capacidad antioxidante total. Estos resultados sugieren que en el hepatopáncreas, el lactato podría estar actuando como un antioxidante y que los radicales  $O_2^-$  podrían estar relacionados con los procesos de defensa celular.
- A partir de los resultados de este trabajo se puede concluir que la hipoxia moderada no tiene efecto sobre el metabolismo oxidativo del camarón blanco; sin embargo, el tiempo de reoxigenación transcurrido después de un período de hipoxia moderada afecta el metabolismo oxidativo de estos camarones.

## RECOMENDACIONES

En base a los resultados de este trabajo se sugieren los siguientes puntos:

1. Exponer a camarones a periodos más largos de hipoxia para corroborar si realmente la exposición a hipoxia no afecta el metabolismo oxidativo del camarón blanco.
2. Exponer a los camarones a ciclos repetidos de hipoxia y reoxigenación para inferir si presentan períodos de adaptación y de recuperación.
3. Realizar un seguimiento de la actividad de enzimas antioxidantes en los tres tejidos; para corroborar si existen enzimas que se activan durante procesos de hipoxia y reoxigenación; dado que las respuestas encontradas en la capacidad antioxidante total de estos tejidos siguen un patrón diferente después de un periodo de reoxigenación.
4. Realizar experimentos con exposición a hipoxia severa (menor de 1 mg O<sub>2</sub>/L) para corroborar si existe un punto crítico en la respuesta del metabolismo oxidativo.
5. Realizar experimentos de exposición a hipoxia y reoxigenación en otras especies de crustáceos para corroborar si los resultados de este estudio son específicos para *Litopenaeus vannamei* o son generales para crustáceos.
6. Para la acuicultura se recomienda que se agregué reoxigenación progresiva, dado que en este trabajo el efecto por reoxigenación abrupta se presentó en las 2 primeras horas de reoxigenación.
7. En los estanques de cultivo de camarón blanco que presenten procesos de hipoxia y reoxigenación se les alimente con dieta rica en antioxidantes, que puedan ayudar a la recuperación de los organismos.

## BIBLIOGRAFÍA

Albert, J., y Ellington, W. R. 1985. Patterns of energy metabolism in the stone crab, *Menippe mercenaria*, during severe hypoxia and subsequent recovery. J. Exp. Zool. 234: 175-183.

Allan, G.L. y Maguire, G.B. 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juveniles *Penaeus monodon*. Aquaculture. 94: 27-37.

Ansaldo M., Luquet M. C., Evelson A. P., Polo J. M. y Llesuy S. 2000. Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. Polar Biol 23:160-165.

Armitage, K. B. y Wall, T. J. 1982. The effect of body size, starvation and temperature acclimation on oxygen consumption of the crayfish *Orconectes nais*. Comp. Biochem. Physiol. 73A(1): 63-68.

BANCOMEXT (1999). Camarón Mexicano. Resuelva Problemas en el cultivo. México. 103 pp.

Blake, D. y Winyard, P. G. 1995. Editors. Immunopharmacology of Free Radical Species. Academic Press : London.

Boyd, C. E. y Watten, B. J., 1989. Aeration systems in aquaculture. Rev. Aquat. Sci. 1(3): 425-472.

Boyd, C. E. 1989. Water quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquaculture Departmental Series No. 2 Auburn University Alabama, 83 pp.

Bray W. A. y Lawrence, A. L. 1992 Reproduction of *Penaeus* species in captivity. Marine shrimp culture: Principles and practices. A. W. Fast and L. J. Lester (Eds.) Elsevier Science Publisher, St Louis, USA. 93 – 170.

Bridges, C. R. y Brand, A.R. 1980. Oxygen consumption and oxygen independence in marine crustaceans. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2: 133 – 141.

Campa-Cordova, A. I. Hernandez-Saavedra, N. Y. De Philippis, R y Ascencio, F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to B-glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 12: 353-366.

Cameron, J. N. y Mágnun, C. P. 1973. Environmental adaptations of respiratory system: Ventilation, circulation and oxygen transport. In: F.J. Vernberg & W.B. Vernberg, (Eds.) *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York. 8: 43-63.

Carreño León, D. P. 2000. Alteraciones metabólicas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en respuesta a la manipulación rutinaria bajo condiciones de cultivo y a la ablación del tallo ocular. Tesis par obtener el grado de Maestro en Ciencias. CICIMAR.

Chen J. y Kou T. 1996. Effects of temperature on oxygen consumption and nitrogenous excretion of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 145: 295 – 303.

Chen, J.C. y Lin, C. Y. 1995. Responses of oxygen consumption ambient ammonia-N excretion and urea-N excretion of *penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture* 136: 243-255.

Chew, S. F. y Low, W. P. 1991. Effects of hypoxia on the mudskipper, *Periophthalmus chrysopilus* (bleeker, 19853). *Journal of Fish Biology* 38: 621-623.

Cheng Wilton, Chun-Hung Liu, Hsu. P.J. y Chen C. J. 2002. Efect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macobrachium rosenbergii* and its sustentability to pathogen *Enterococcus*. *Fish y Shellfish Immunology* 13: 351-365.

Cheng-Wilton, Chun-Hung, Liu, ChingMing Kuo. 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) *Aquaculture* 220: 843-856.

Dalla-Via, G. J. 1987. effects of salinity and temperature on oxygen consumption in a freshwater population of *Palaemonetes antennarius* (Crustacea, Decapoda) *Comp. Biochem. Physiol.* 88A(2): 299-305.



Díaz-Herrera, F., Bucle-Ramírez, L. F. 1993. Effect of salinity on oxygen consumption and ammonium excretion in *Macrobrachium rosebergii* (Crustacea: Palaemonidae). Abstract.

Drossos G., A. Lazou, P. Panagopoulos y Westaby, S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thorac. Surg.* 59: 169-172.

Fandrey, J. 1995. Hypoxia-inducible gene expression. *Respiration Physiology* 101: 1-10.

Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201: 1203-1209.

Gade, C. G. 1984. Anaerobic Energy Metabolism. En: Hoffman K. H. (Ed.), *Environmental and biochemistry of insects*. Springer Erlang. 119 – 136.

Gibson, R. y Barker, P. L. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17: 285 – 346.

Gil-del Valle, L. Martínez-Sánchez, G. González-Blanco, I. Pérez-Avila, J. 1999. Estrés oxidativo: mecanismos involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Bioquímica* 24: 85-93.

Groussard, C., Morel, I. Chevanne, M. Monnier, M. Cillard, J. y Delamarche, A. 2000. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Physiological Society* 89: 69-175.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now. *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 2000. Free radicals, in *Biology and Medicine*. Oxford Science Publ. Third Edition. London. 936 pp.

Hendrickx, E. M. 1995. Los camarones *Penaeoidea* bentónicos (Crustacea: Decápoda: Dendobranchiata) del Pacífico mexicano. CONABIO-UNAM. 150 pp.

Hendrickx, E. M. 1996. Camarones pp. 417-537. En: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Carpenter, K., Summer, C. & Niem, V. (Eds.) Guia FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacifico Centro-Oriental. Vol I. Plantas e Invertebrados. Food and Agriculture Organization, United Nations, Rome.

Hermes-Lima M. y Storey, K. B. 1993. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* 265: R646-R652.

Hermes-Lima, M. Storey, J. M. y Storey, K. B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120 B: 437-448.

Hermes-Lima, M. Storey, J. M. y Storey, K. B. 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. En *Protein Adaptations and Signal Transduction*. Edited by K. B. Storey and J. M. Storey. Achapter 20: 263-287.

Herreid II, C. F. 1980. Hypoxia in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 67 A : 311 – 320.

Hill, A .D. Taylor, A. C. y Strang, R. H. 1991. Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenasi* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. *J. Exp. Biol. Ecol* 150: 31-50.

Hochacka, P. Lutz, P. Sick, T; Rosenthal, M; Vanden Thillart, G. 1992. Surviving hipoxia: mechanisms of control and adaptation CRC Press, Inc. 544 pp.

Jian-Chu, C. y Sen-Huan, L. 1993. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-n excretion of juvenile *Penaeus japonicus*. *Journal. Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 165 (2): 161 – 170.

Kurmaly, K.. Yule, A. B. y Jones, D. A. 1989. Effects of body size and temperature on the metabolic rate of *Penaeus monodon*. *Mar. biol.* 103: 25 – 30.

Lushchak, V. Lushchak L. Mota, A. y Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative Stress and antioxidant defenses in goldfish *Caraassius auratus* during anoxia and reoxygenation. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol 280:100-107.

Martínez -Cayuela, M. 1998. Toxicidad de xonobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Polígono Universitario de Cartuja, S/n. Universidad de Granada. Granada 18071. España. 399 (1): 5-18.

Martínez Córdova L. R. 1993. Camaronicultura, bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Sonora. AGT Editor. 233 p.

McMahon B., Burggren W. y Wilkens J. 1974. Respiratory responses to long term Hypoxia in the crayfish *Orconectes viriliss* J. Exp.Biol. 60: 195-206.

Mcnamara, J. C., Moreira, G. S., Moreira, P. S. 1982. The effect of salinity on the respiratory metabolism and duration of intermoult cycle in larval and adult *Macrobrachium olfersii* (weigmann) (decapoda, Palamonidae). Abstrac. Biol. Fisiol. Anim. Univ. Sao Paulo. 6: 117 – 125.

Morán-Morales L. 2003. Niveles ácido láctico en hemolinfa y músculo de camarón café *Penaeus californiensis* (Holmes, 1900). En diferentes grados de Hipoxia, Alcalosis e Hiperamonia. Tesis de licenciatura. La Paz B. C. Sur 93 pp.

Morris, S. 1996. Air breathing by the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). IV. Aquatic hypoxia as an impetus for emersion? Oxygen uptake, respiratory gas transport, and acid-base state. Physiol. Zool. 69 (4): 864-886.

Nelson, S.C. Knight, A. W. y Li, H. W. 1977. The metabolic cost of foot utilization and ammonia production by juvenile *Machrobrachium roseembergii* (Crustacea, Paleamonidae). Comp. Biochem. Physiology. 56 A: 67 – 72.

Newell, R. C. 1969. Effect of fluctuations in temperature on the metabolism of intertidal invertebrates. Am. Zool. 9: 293 – 307.

Nicovita.2001.El oxígeno disuelto en estanques de cultivo. Boletín Marzo, Volumen 6 Edición 3.

Nusetti O. , Esclapes M. , Salazar G. , Nusetti S. y Puldo S. .2001. Biomarkers of Oxidative Stress in the Polychaete *Eurythone complanata* (Amphinomidae) Under Short Term Copper Exsure. Bull . Environ. Contam. Toxicol. 66: 576-581.

Ohkawa H., N. Ohishi y K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 331-358.

Palacios E., Ibarra M. A. y Racotta S.I. 2000 . Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 185: 353-371.

Pannunzio, T. M. y Storey, K. B. 1998. Antioxidante defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 221: 277-292.

Pascual P., Pedrajas R.J, Toribio F. Lopez-BareaJ. Peinado J. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata* ). Chemicobiological interactions 145: 191-199.

Penkoff, S. J. y Thurberg, F. P. 1982. Changes in oxygen consumption of the American lobster, *Homarus americanus*, during the molt cycle. Comp. Biochem. Physiol. 72 A (4): 44 – 48.

Pérez G. P. y Pérez de Alejo J. L. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. Revista Cubana Medica Militar 29 (3): 192 – 198.

Persky A.M., P.S. Green, L. Stublely, C.O. Howell, L. Zaulyanov, G. A. Brazaeva y J.W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 223: 59-66.

Poeggeler, B., Reiter, R., Tan, D. X., Chen, L. D. Y Manchester, L. C. 1993. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: hipótesis. J. Pineal Res. 14: 151-168.

Pritchard, A. W. y S. Eddy. 1979. Lactate formation in *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis* ( Crustacea: Thalassinidae). Mar. Biol.. Berlin. 50: 249-253.

Racotta, I. S. y Palacios E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society. 29(3): 351 – 356.

Racotta, I. S. y Hernández-Herrera, R. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comparative Biochemistry and Physiology Part 125 A: 437-443.

Reiter, R. J. 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain. J. FASEB 9: 526-533.

Rosas, C., Ocampo., L. Gaxiola, G., Sánchez, A. Y Soto, L. 1999. Effect of salinity on survival, growth and oxygen consumption of postlarvae (PL 10-PL21) of *Litopenaeus setiferus*. Journal of Crustacean Biology 19 (2): 244 – 251.

Rosenberry, B. 2001 World Shrimp Farming 2001 Shrimp News international, San Diego, California, 316 p.

Seidman, E. R. y Lawrence, A. L. 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. J. World Maricult. Soc. 16: 333-346.

Selye, H. 1956. The stress of life. McGraw-Hill, New York.

Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. Eur J. Biochem 215: 213-9.

Silva, S. C. y Regnault, M. 1980. Variations of oxygen consumption in the shrimp *Palaemon serratus* during the intermolt cycle. Cah. Biol. Mar. 121 (3): 279 – 286.

Storey, K.B. y J. M. Storey, 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptations in anaerobiosis, hibernation and estivation. Q. Rev. Biol. 65: 145-174.

Taylor, A. C. y J. I. Spicer. 1987. Metabolic responses of the prawns *Palaemon elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. Department of Zoology, University of Marine Biology 95: 521-530.

Thomas, P. 1990. Molecular and Biochemical Responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. In: Biological indicators of stress in fish. Marshall-Adams, S. (Eds.). American Fisheries Symposium 8, Bethesda, Maryland, 9 – 28 pp.

Toyokoni S. T. 1996. Induced carcinogenesis: the role of redox regulation. free rad. Biol. Med.; 120: 553-66

Van Aardt W. J. 1988. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamon warreni* Calman, during anoxia subsequent recovery. Comp. Biochem. Physiol. 919 (2): 299-304.

Van Aardt, W. J y C. T. Wolmarans. 1987. Effects of anoxia on the haemolymph Physiology and lactate concentration in the freshwater crab *Potamon warreni* Calman. Comp. Biochem. Physiol. 88 (4): 671-675.

Villareal, H. C. 2002. Avances en la nutrición de *Cherax quadricarinatus* En. Avances en nutrición acuicola VI. Memorias de VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 3 – 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Villareal, H. y Ocampo, L. 1993. Effect of size and temperature on the oxygen consumption of the brown shrimp *Penaeus californiensis* (Holmes, 1990). Comp. Biochem. Physiol. (1) 106 A: 97 – 101.

Villareal, H., Hinojosa, P., Naranjo, J., 1994. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. Comp. Biochem. Physiol. 108 A: 331 – 336.

Villareal, H., y Rivera, J. A. 1993. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus californiensis* postlarvae. Comp. Biochem. Physiol. 106 A: 103 – 107.

Volicer, L. y P.B. Crino. 1990. Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: A hypothesis. Neurobiol. Aging 11 (5): 567-571.

Wedemeyer, G. A., y McLeay D. J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. in A. D. Pickering (Eds.). London and New York: Academic Press. 274 – 275 pp.

Wolvekamp, N.R y Waterman, T.H. 1960. Respiration In: T. H Waterman (Editor ), The Physiology of Crustacea. Academic Press, New York, 670 pp.

Wu, R. S. 2002. Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses. Marine Pollution Bulletin 45: 35 – 45.

Zebe, E. 1982 Anaerobic metabolism in *Upogebia pugettensis* and *Callinassa californiensis*. Comp. Biochem. physiol., 72B: 613-618.

Zeis, B., Neiss, C. Bridges, C. R. y Grieshaber, M. K. 1992. Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by l-lactate and urate in the lobster *Homurus vulgaris*. J. exp. Biol. 168: 93-110.

Zenteno- Savin T..2002 Oxidative Stress in marine organisms: A review. Research signpost . ISBN: 81: 67-76

Zenteno-savin T., J. Vazquez-Medina, N. M. Kiemer-Martinez, y E. Cortes-Jacinto. 2004. Effect of dietary and lipid levels oxidative stress of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (decapoda : Prastacidae).

Zou, E. Du, N. y Lai, W. 1996. the effect of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in di blood of di Chinese freshguaders crap *Eriocheir sinens* (crustacea Decapoda). Comp. Biochem. Physiology. 114(2): 150-109.

Tabla 1. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en tejidos de camarones blancos mantenidos bajo condiciones control. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (n). Letras diferentes representan diferencias significativas  $p < 0.05$

	lactato total (mg/g)	$O_2^-$ (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	Capacidad antioxidante total (% inhibición)
Músculo	0.760 $\pm$ 0.086 (6) a	0.010 $\pm$ 0.002 (19) a	25.04 $\pm$ 6.22 (16) a	68.23 $\pm$ 14.27 (15) a
Branquias	0.684 $\pm$ 0.282 (7) a	0.033 $\pm$ 0.005 (18) a	56.48 $\pm$ 6.683 (16) a	146.22 $\pm$ 12.77 (15) b
Hepatopáncreas	0.406 $\pm$ 0.114 (17) a	0.241 $\pm$ 0.037 (21) b	198.24 $\pm$ 25.19 (18) b	102.33 $\pm$ 13.54 (6) a



Tabla 2. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en músculo de camarones blancos en la primera etapa experimental: Exposición a hipoxia. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (n).

Músculo	lactato total (mg/g)	$O_2^-$ (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	Capacidad antioxidante total (% inhibición)
Control	0.760 $\pm$ 0.086 (6)	0.010 $\pm$ 0.002 (19)	25.04 $\pm$ 6.22 (16)	68.23 $\pm$ 14.27 (15)
Hipoxia 6 horas	0.763 $\pm$ 0.209 (4)	0.010 $\pm$ 0.002 (6)	57.30 $\pm$ 17.78 (5)	39.01 $\pm$ 7.35 (5)
Hipoxia 12 horas	0.759 $\pm$ 0.212 (4)	0.011 $\pm$ 0.005 (6)	15.33 $\pm$ 4.20 (5)	67.57 $\pm$ 25.11 (5)
Hipoxia 24 horas	1.013 $\pm$ 0.415 (4)	0.007 $\pm$ 0.002 (6)	33.64 $\pm$ 12.01 (5)	146.91 $\pm$ 24.80 (3)
Hipoxia 6 horas más 1 hora de reoxigenación	0.729 $\pm$ 0.154 (4)	0.011 $\pm$ 0.003 (7)	20.25 $\pm$ 4.20 (6)	70.55 $\pm$ 33.43 (4)
Hipoxia 12 horas más 1 hora de reoxigenación	0.523 $\pm$ 0.108 (4)	0.008 $\pm$ 0.002 (6)	17.55 $\pm$ 8.25 (5)	70.32 $\pm$ 17.18 (4)
Hipoxia 24 horas más 1 hora de reoxigenación	0.805 $\pm$ 0.230 (4)	0.011 $\pm$ 0.002 (6)	25.96 $\pm$ 8.15 (4)	55.17 $\pm$ 34.85 (5)
N	30 N S	56 N S	46 N S	41 N S
N S = No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.				

Tabla 3. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en branquias de camarones blancos en la primera etapa experimental: Exposición a hipoxia. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (n).

Branquias	lactato total (mg/g)	$O_2^{\cdot-}$ (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	Capacidad antioxidante total (% inhibición)
Control	0.684 $\pm$ 0.282 (7)	0.033 $\pm$ 0.005 (18)	56.48 $\pm$ 6.683 (16)	146.22 $\pm$ 12.77 (15)
Hipoxia 6 horas	0.721 $\pm$ 0.237 (4)	0.025 $\pm$ 0.008 (6)	41.979 $\pm$ 2.25 (5)	147.63 $\pm$ 23.4 (5)
Hipoxia 12 horas	0.513 $\pm$ 0.217 (4)	0.051 $\pm$ 0.016 (7)	59.79 $\pm$ 13.16 (5)	139.68 $\pm$ 24.38 (5)
Hipoxia 24 horas	0.894 $\pm$ 0.399 (4)	0.043 $\pm$ 0.01 (6)	41.15 $\pm$ 8.75 (5)	140.56 $\pm$ 26.06 (5)
Hipoxia 6 horas más 1 hora de reoxigenación	0.488 $\pm$ 0.126 (4)	0.028 $\pm$ 0.01 (5)	55.95 $\pm$ 22.17 (6)	145.93 $\pm$ 24.21 (5)
Hipoxia 12 horas más 1 hora de reoxigenación	0.405 $\pm$ 0.233(4)	0.031 $\pm$ 0.012 (7)	65.28 $\pm$ 18.73 (5)	124.21 $\pm$ 26.51 (5)
Hipoxia 24 horas más 1 hora de reoxigenación	1.046 $\pm$ 0.206 (4)	0.048 $\pm$ 0.018 (6)	55.21 $\pm$ 8.76 (4)	147.20 $\pm$ 32.71 (4)
N	31 N S	55 N S	46 N S	44 N S

N S = No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Tabla 4. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en hepatopáncreas de camarones blancos en la primera etapa experimental: Exposición a hipoxia. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (n).

Hapatopáncreas	lactato total (mg/g)	$O_2^{\cdot-}$ (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	Capacidad antioxidante total (% inhibición)
Control	0.406 $\pm$ 0.114 (17)	0.241 $\pm$ 0.037 (21)	198.24 $\pm$ 25.19 (18)	102.33 $\pm$ 13.54 (6)
Hipoxia 6 horas	0.436 $\pm$ 0.116 (6)	0.355 $\pm$ 0.123 (6)	249.59 $\pm$ 62.54 (6)	npt
Hipoxia 12 horas	0.395 $\pm$ 0.153 (6)	0.326 $\pm$ 0.136 (7)	156.26 $\pm$ 35.02 (6)	50.58 $\pm$ 34.29 (4)
Hipoxia 24 horas	0.3590 $\pm$ 0.289 (5)	0.224 $\pm$ 0.063 (7)	192.88 $\pm$ 41.89 (6)	npt
Hipoxia 6 horas más 1 hora de reoxigenación	0.214 $\pm$ 0.057 (5)	0.316 $\pm$ 0.080 (7)	281.20 $\pm$ 63.91 (6)	npt
Hipoxia 12 horas más 1 hora de reoxigenación	0.507 $\pm$ 0.304 (6)	0.393 $\pm$ 0.106 (7)	138.38 $\pm$ 15.78 (6)	45.42 $\pm$ 15.42 (4)
Hipoxia 24 horas más 1 hora de reoxigenación	0.701 $\pm$ 0.303 (3)	0.225 $\pm$ 0.047 (5)	135.16 $\pm$ 25.16 (5)	58.61 $\pm$ 29.96 (3)
N	48 N S	60 N S	53 N S	21 N S
N S = No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.				

Tejido	lactato total (mg/g)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	Capacidad antioxidante total (% inhibición)
Músculo	0.973 ± 0.097 (32) b	0.016 ± 0.004 (31) a	33.02 ± 4.533 (33) a	74.774 ± 6.065 (31) a
Branquias	0.531 ± 0.103 (29) a	0.020 ± 0.003 (30) a	53.332 ± 7.154 (34) a	168.579 ± 30.541 (32) b
Hepatopáncreas	0.376 ± 0.057 (36) a	0.155 ± 0.024 (32) b	128.05 ± 18.223 (34) b	129.923 ± 27.698 (22) a

Tabla 5. Niveles de lactato total, radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en tejidos de camarones blancos mantenidos bajo condiciones control. Los datos se presentan como media ± error estándar (n). Letras diferentes representan diferencias significativas p < 0.05

Tabla 6. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^-$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en músculo de camarón blanco en la segunda etapa experimental: Exposición a reoxigenación. Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (n). Letras diferentes representan diferencias significativas  $p < 0.05$

Músculo	lactato total (mg/g)	$O_2^-$ (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	Capacidad antioxidante total (% inhibición)
Control	0.973 $\pm$ 0.097 (32)	0.016 $\pm$ 0.004 (31)	33.02 $\pm$ 4.533 (33)	74.774 $\pm$ 6.065 (31)
Hipoxia 24 horas	0.810 $\pm$ 0.117 (33)	0.013 $\pm$ 0.003 (31)	34.651 $\pm$ 4.601 (33)	83.976 $\pm$ 5.456 (26)
Reoxigenación 1 hora	1.196 $\pm$ 0.251 (3)	0.011 $\pm$ 0.002 (6)	25.58 $\pm$ 8.49 (4)	21.23 $\pm$ 10.21 (4)
Reoxigenación 2 horas	1.167 $\pm$ 0.259 (6)	0.071 $\pm$ 0.019 (3)	10.683 $\pm$ 1.615 (6)	100.947 $\pm$ 8.672 (6)
Reoxigenación 3 horas	0.881 $\pm$ 0.210 (6)	0.005 $\pm$ 0.001 (5)	28.78 $\pm$ 6.397 (6)	82.148 $\pm$ 10.288 (6)
Reoxigenación 4 horas	0.653 $\pm$ 0.164 (6)	0.014 $\pm$ 0.003 (6)	52.419 $\pm$ 14.805 (6)	68.237 $\pm$ 9.449 (6)
Reoxigenación 5 horas	0.927 $\pm$ 0.287 (6)	0.009 $\pm$ 0.001 (6)	53.049 $\pm$ 9.095 (6)	46.318 $\pm$ 4.761 (6)
Reoxigenación 6 horas	1.106 $\pm$ 0.361 (5)	0.019 $\pm$ 0.010 (6)	37.763 $\pm$ 6.219 (6)	63.566 $\pm$ 10.898 (6)
N	97	94	100	91
P	0.716	0.000	0.083	0.000
P < 0.05 diferencias significativas				

Tabla 7. Niveles de lactato total, radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en branquias de camarón blanco en la segunda etapa experimental: Exposición a reoxigenación. Los datos se presentan como media  $\pm$  error (n). Letras diferentes representan diferencias significativas  $p < 0.05$

Branquias	lactato total (mg/g)	$O_2^{\cdot-}$ (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	Capacidad antioxidante total (% $\square$ nhibición)
Control	0.531 $\pm$ 0.103 (29)	0.020 $\pm$ 0.003 (30)	53.332 $\pm$ 7.154 (34)	168.579 $\pm$ 30.541 (32)
Hipoxia 24 horas	0.507 $\pm$ 0.086 (32)	0.028 $\pm$ 0.004 (30)	65.194 $\pm$ 7.537 (28)	156.902 $\pm$ 24.344 (22)
Reoxigenación 1 hora	1.098 $\pm$ 0.283 (3)	0.048 $\pm$ 0.018 (6)	54.779 $\pm$ 9.162 (4)	147.205 $\pm$ 32.715 (4)
Reoxigenación 2 horas	0.361 $\pm$ 0.105 (6)	0.028 $\pm$ 0.005 (2)	40.72 $\pm$ 9.095 (6)	184.722 $\pm$ 49.147 (6)
Reoxigenación 3 horas	0.462 $\pm$ 0.080 (6)	0.009 $\pm$ 0.003 (5)	52.882 $\pm$ 4.654 (6)	289.887 $\pm$ 83.647 (6)
Reoxigenación 4 horas	0.411 $\pm$ 0.100 (6)	0.022 $\pm$ 0.009 (6)	71.746 $\pm$ 14.85 (5)	85.274 $\pm$ 9.546 (6)
Reoxigenación 5 horas	0.529 $\pm$ 0.267 (5)	0.032 $\pm$ 0.006 (6)	44.92 $\pm$ 7.466 (6)	27.778 (1)
Reoxigenación 6 horas	0.145 $\pm$ 0.019 (5)	0.016 $\pm$ 0.003 (6)	76.709 $\pm$ 27.529 (6)	143.246 $\pm$ 10.295 (6)
N	92	91	95	83
P	0.301	0.057	0.615	0.351
P < 0.05 diferencias significativas				

camarón blanco en la segunda etapa experimental: Exposición a reoxigenación. Los datos se presentan como media  $\pm$  error (n). Letras diferentes representan diferencias significativas  $p < 0.05$

Hepatopáncreas	lactato total (mg/g)	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol/min*g)	TBARS (nmol/g)	antioxidante total (% $\square$ nhibición)
Control	0.376 $\pm$ 0.057 (36)	0.155 $\pm$ 0.024 (32)	128.05 $\pm$ 18.223 (34)	129.923 $\pm$ 27.698 (22)
Hipoxia 24 horas	0.478 $\pm$ 0.082 (34)	0.157 $\pm$ 0.020 (31)	140.46 $\pm$ 17.914 (34)	100.472 $\pm$ 9.574 (24)
Reoxigenación 1 hora	0.907 $\pm$ 0.221 (6)	0.227 $\pm$ 0.060 (4)	128.333 $\pm$ 31.208 (4)	36.952 $\pm$ 12.883 (3)
Reoxigenación 2 horas	0.480 $\pm$ 0.200 (6)	0.046 $\pm$ 0.036 (4)	84.213 $\pm$ 13.819 (6)	192.799 $\pm$ 80.757 (4)
Reoxigenación 3 horas	0.281 $\pm$ 0.033 (6)	0.154 $\pm$ 0.047 (5)	145.793 $\pm$ 44.421 (6)	86.908 $\pm$ 12.345 (6)
Reoxigenación 4 horas	0.152 $\pm$ 0.029 (6)	0.194 $\pm$ 0.020(5)	150.342 $\pm$ 18.176 (6)	99.389 $\pm$ 11.195 (6)
Reoxigenación 5 horas	0.439 $\pm$ 0.156 (6)	0.208 $\pm$ 0.042 (6)	118.047 $\pm$ 30.896 (6)	106.061 $\pm$ 3.706 (3)
Reoxigenación 6 horas	0.279 $\pm$ 0.075 (6)	0.165 $\pm$ 0.038 (6)	87.595 $\pm$ 24.511 (6)	69.689 $\pm$ 34.792 (5)
N	106	93	102	73
P	0.051	0.052	0.836	0.321
P < 0.05 diferencias significativas				

nexo 1

**PRIMERA PARTE EXPERIMENTAL: Exposición a hipoxia.**

Músculo

Análisis de varianza realizado a la concentración de **lactato total**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Lactato N = 18, R: 0.611, R<sup>2</sup>: 0.373

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	1.306	6	0.218	1.091	0.425
Error	2.194	11	0.199		

Análisis de varianza realizado a la producción de **radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Radical superóxido N = 56 R: 0.165 R<sup>2</sup>: 0.027.

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	0.000	6	0.000	0.227	0.966
Error	0.003	49	0.000		

Análisis de varianza realizado a la **peroxidación de lípidos (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. TBARS N = 46 R: 0.476 R<sup>2</sup> 0.226.

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	6280.591	6	1046.765	1.899	0.105
Error	21496.283	39	551.187		

Análisis de varianza realizado a la **capacidad antioxidante total**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Capacidad antioxidante total N = 41 R: 0.198 R<sup>2</sup>: 0.039.

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	4153.347	6	692.225	0.232	0.963
Error	101419.806	34	2982.935		



## Branquias

Análisis de varianza realizado a la concentración de **lactato total**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Lactato total N = 31 R: 0.744 R<sup>2</sup>: 0.553

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	4.506	6	0.751	4.952	0.002
Error	3.640	24	0.152		

Análisis de varianza realizado a la producción de **radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Radical superóxido N = 55 R: 0.295 R<sup>2</sup>: 0.087.

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	0.004	6	0.001	0.765	0.601
Error	0.041	48	0.001		

Análisis de varianza realizado a la **peroxidación de lípidos (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. TBARS N = 46 R: 0.246 R<sup>2</sup>: 0.060

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	2472.990	6	412.165	0.417	0.863
Error	38516.094	39	987.592		

Análisis de varianza en la **capacidad antioxidante total**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Capacidad antioxidante total N = 44 R: 0.141 R<sup>2</sup>: 0.020

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	2218.801	6	369.800	0.125	0.993
Error	109322.369	37	2954.659		

## Hepatopáncreas

Análisis de varianza realizado a la concentración de **lactato total**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Lactato total N = 48 R: 0.247 R<sup>2</sup>: 0.061

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	0.630	6	0.105	0.445	0.844
Error	9.678	41	0.236		

Análisis de varianza realizado a la producción de **radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Radical superóxido N = 60 R: 0.269 R<sup>2</sup>: 0.073

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	0.214	6	0.036	0.691	0.658
Error	2.740	53	0.052		

Análisis de varianza realizado a la **peroxidación de lípidos (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. TBARS N = 53 e R: 0.408 R<sup>2</sup> 0.167

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	108813.913	6	18135.652	1.534	0.188
Error	543694.703	46	11819.450		

Análisis de varianza en la **capacidad antioxidante total**, determinada a camarones expuestos a 6, 12 y 24 horas de hipoxia más 1 hora de reoxigenación. Capacidad antioxidante total N = 22 R: 0.504 R<sup>2</sup>: 0.254

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	11640.069	6	1940.011	0.849	0.552
Error	34267.204	15	2284.480		

## Anexo 2

### **SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL: Exposición a reoxigenación.**

#### Músculo

Análisis de varianza realizado a la concentración de **lactato total**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Lactato total N = 97 R: 0.220 R<sup>2</sup>: 0.048.

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	1.696	7	0.242	0.646	0.716
Error	33.350	89	0.375		

Análisis de varianza realizado a la producción de **radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Radical superóxido N = 94 R: 0.526 R<sup>2</sup>: 0.276

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	0.010	7	0.001	4.694	0.000
Error	0.027	86	0.000		

Prueba post hoc de Bonferroni.

Matriz de comparación entre los tratamientos experimentales. C = control, H = 24 horas de hipoxia y números = horas de reoxigenación.

	C	H	1	2	3	4	5	6
C	1.000							
H	1.000	1.000						
1	1.000	1.000	1.000					
2	0.000	0.000	0.000	1.000				
3	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000			
4	1.000	1.000	1.000	0.001	1.000	1.000		
5	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	
6	1.000	1.000	1.000	0.002	1.000	1.000	1.000	1.000

Análisis de varianza realizado a la **peroxidación de lípidos (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. TBARS N = 100 R: 0.35 R<sup>2</sup>: 0.125

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	8042.382	7	1148.912	1.872	0.083
Error	56448.702	92	613.573		

Prueba post hoc de Bonferroni.

Matriz de comparación entre los tratamientos experimentales. C = control, H = 24 horas de hipoxia y números = horas de reoxigenación.

	C	H	1	2	3	4	5	6
C	1.000							
H	1.000	1.000						
1	1.000	1.000	1.000					
2	1.000	0.890	1.000	1.000				
3	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
4	1.000	1.000	1.000	0.124	1.000	1.000		
5	1.000	1.000	1.000	0.109	1.000	1.000	1.000	
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Análisis de varianza realizado a la **capacidad antioxidante total (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Capacidad antioxidante total N = 91 R: 0.513 R<sup>2</sup>

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	23944.154	7	3420.593	4.227	0.000
Error	67168.462	83	809.259		

Prueba post hoc de Bonferroni.

Matriz de comparación entre los tratamientos experimentales. C = control, H = 24 horas de hipoxia y números = horas de reoxigenación.

	C	H	1	2	3	4	5	6
C	1.000							
H	1.000	1.000						
1	0.018	0.003	1.000					
2	1.000	1.000	0.001	1.000				
3	1.000	1.000	0.038	1.000	1.000			
4	1.000	1.000	0.344	1.000	1.000	1.000		
5	0.772	0.125	1.000	0.037	0.895	1.000	1.000	
6	1.000	1.000	0.662	0.712	1.000	1.000	1.000	1.000

Branquias

Análisis de varianza realizado a la concentración de **lactato total**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Lactato total N = 92 R: 0.304 R<sup>2</sup>: 0.092

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	1.907	7	0.272	1.220	0.301
Error	18.752	84	0.223		

Análisis de varianza realizado a la producción de **radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Radical superóxido N = 91 R: 0.385 R<sup>2</sup>:0.1480.190

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	0.006	7	0.001	2.058	0.057
Error	0.035	83	0.000		

Prueba post hoc de Bonferroni.

Matriz de comparación entre los tratamientos experimentales. C = control, H = 24 horas de hipoxia y números = horas de reoxigenación.

	C	H	1	2	3	4	5	6
C	1.000							
H	1.000	1.000						
1	0.113	1.000	1.000					
2	1.000	1.000	1.000	1.000				
3	1.000	1.000	0.079	1.000	1.000			
4	1.000	1.000	0.943	1.000	1.000	1.000		
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
6	1.000	1.000	0.242	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Análisis de varianza realizado a la **peroxidación de lípidos (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. TBARS N = 95 R: 0.241 R<sup>2</sup>: 0.058

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	8251.904	7	1178.843	0.769	0.615
Error	133328.536	87	1532.512		

Análisis de varianza realizado a la **capacidad antioxidante total**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Capacidad antioxidante total N = 83, R: 0.309 R<sup>2</sup>: 0.096

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	158838.850	7	22691.264	1.134	0.351
Error	1500200.486	75	20002.673		

## Hepatopáncreas

Análisis de varianza realizado a la concentración de **lactato total**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Lactato total N = 106 R: 0.361 R<sup>2</sup>: 0.130

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	2.295	7	0.328	2.091	0.051
Error	15.367	98	0.157		

Prueba post hoc de Bonferroni.

Matriz de comparación entre los tratamientos experimentales. C = control, H = 24 horas de hipoxia y números = horas de reoxigenación.

	C	H	1	2	3	4	5	6
C	1.000							
H	1.000	1.000						
1	0.085	0.458	1.000					
2	1.000	1.000	1.000	1.000				
3	1.000	1.000	0.207	1.000	1.000			
4	1.000	1.000	0.037	1.000	1.000	1.000		
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
6	1.000	1.000	0.202	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Análisis de varianza realizado a la producción de **radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Radical superóxido N = 93 R: 0.378 R<sup>2</sup>: 0.143.

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	0.296	7	0.042	2.095	0.052
Error	1.773	85	0.020		

Prueba post hoc de Bonferroni.

Matriz de comparación entre los tratamientos experimentales. C = control, H = 24 horas de hipoxia y números = horas de reoxigenación.

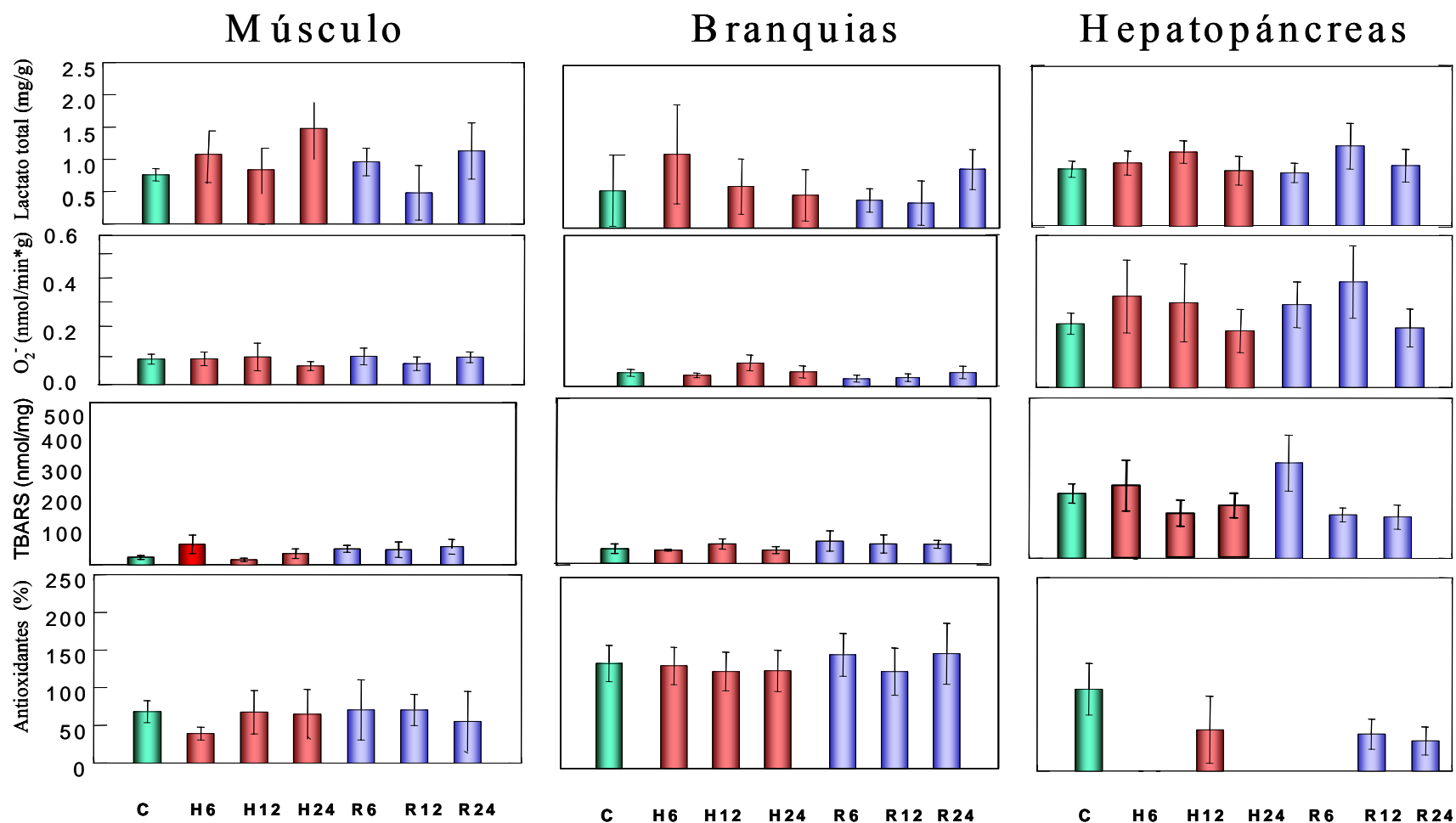
	C	H	1	2	3	4	5	6
C	1.000							
H	1.000	1.000						
1	0.458	1.000	1.000					
2	1.000	1.000	0.020	1.000				
3	1.000	0.458	1.000	0.458	1.000			
4	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000		
5	1.000	1.000	1.000	0.458	1.000	1.000	1.000	
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Análisis de varianza realizado a la **peroxidación de lípidos (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. TBARS N = 102 R: 0.189 R<sup>2</sup>: 0.036.

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	31963.582	7	4566.226	0.496	0.836
Error	865841.406	94	9211.079		

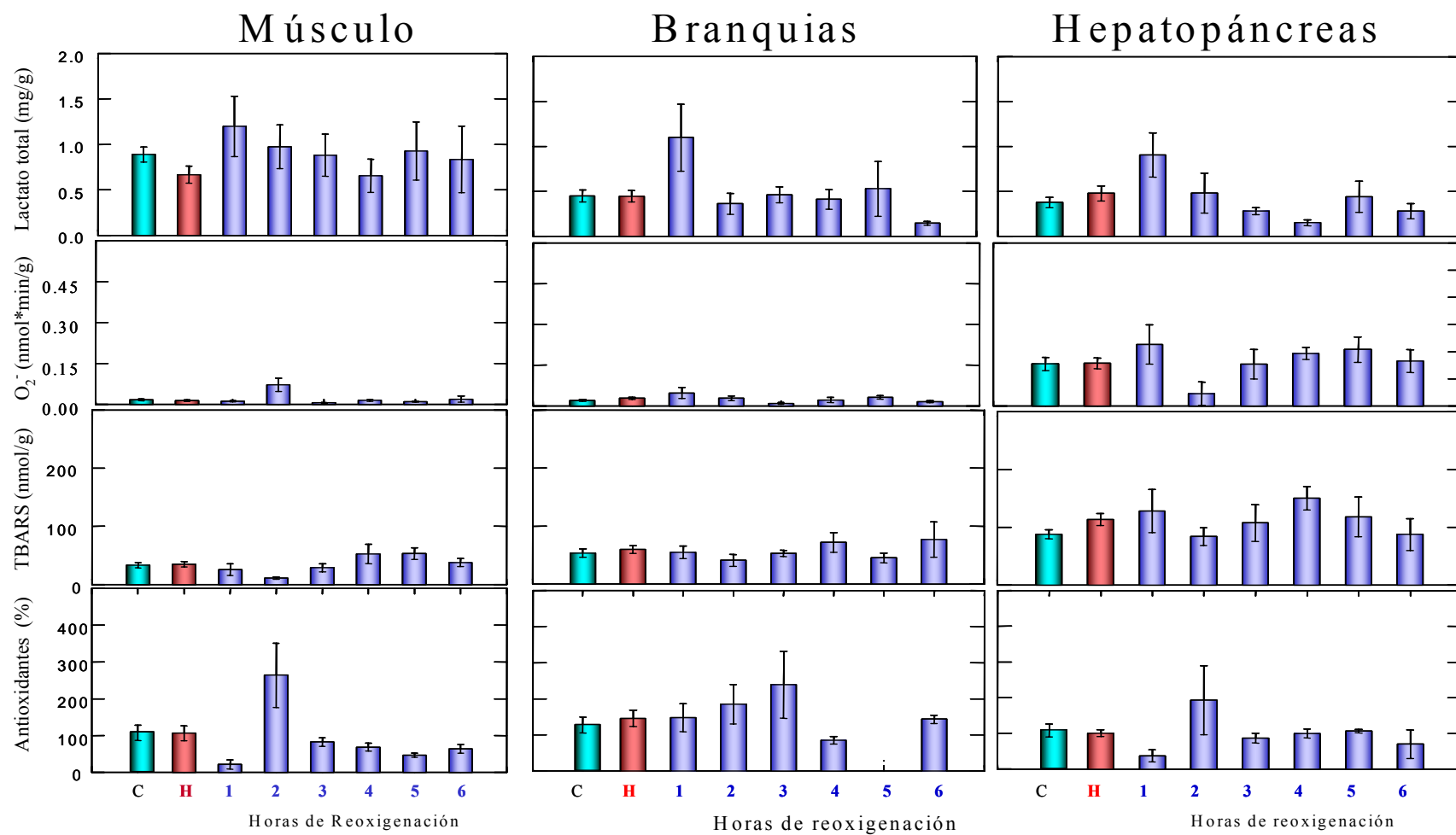
Análisis de varianza realizado a la **capacidad antioxidante total (TBARS)**, determinada a camarones expuestos a 24 horas de hipoxia más reoxigenación 1, 2, 3, 4, 5, y 6 horas. Capacidad antioxidante total N = 73 R: 0.337 R<sup>2</sup>: 0.114

Análisis de varianza					
Fuentes de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	66267.585	7	9466.798	1.190	0.321
Error	516906.573	65	7952.409		



Anexo III.- Niveles de lactato total, Producción de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuestos en la primera fase experimental: Exposición a hipoxia.





Anexo III.- Niveles de lactato total, Producción de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peroxidación de lípidos (TBARS) y capacidad antioxidante total en los tejidos músculo, branquias y hepatopáncreas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, expuestos en la segunda fase experimental: Exposición a reoxigenación.