



MANUAL DE MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE COMPONENTES SANGUÍNEOS DE CAMARONES PENEIDOS



Cristina Pascual, Ariadna Sánchez, Carlos Rosas

Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental

Fac. de Ciencias UNAM

Cd. del Carmen, Campeche

Octubre 2003,

INTRODUCCIÓN

México ocupa el segundo lugar en el cultivo de camarón en el continente americano, y aún así, la producción no satisface la demanda de mercado. El aumento en la producción de este recurso requiere solventar problemas asociados a las condiciones de cultivo, como son las enfermedades y la obtención de semilla de buena calidad.

En este contexto, establecer programas preventivos que permitan monitorear el estado fisiológico de los camarones en cultivo se torna indispensable como una medida para conocer el estado de salud de los camarones en cultivo, y con ello, proporcionar elementos de decisión que ayuden a mejorar la rentabilidad de esta actividad productiva.

Actualmente, el desarrollo de las herramientas de evaluación bioquímica permite diseñar métodos de diagnóstico del estado nutricional de los organismos y, por lo tanto, de salud general de los organismos cultivados. El estado fisiológico de los crustáceos y de muchos organismos acuáticos depende de los factores del medio, entre los cuales, el alimento es uno de los principales, por aportar a los camarones, a través de las proteínas, lípidos y carbohidratos, las moléculas base que son utilizadas como fuente de energía y de moléculas estructurales. También son importantes las vitaminas y los minerales, los cuales actúan como factores esenciales para el buen funcionamiento de la maquinaria enzimática permitiendo la asimilación adecuada de los nutrientes ingeridos.

Las proteínas, compuestos constituidos por unidades más sencillas, los aminoácidos, no sólo ocupan una posición central por ser la base para la formación de enzimas, hormonas, hemocianina, componentes de la respuesta inmunitaria, sino que además intervienen directamente en la construcción de tejidos (crecimiento), y en la reparación y mantenimiento de estos. Asimismo, son fuente de energía en los procesos catabólicos y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Los lípidos son insolubles en agua, y entre ellos se tienen a los triacilglicéridos, que son ésteres de ácidos grasos y glicerina, y representan la mayor fuente de energía y la forma predominante de almacenamiento. Otro compuesto lipídico de importancia es el colesterol, el cual no puede ser sintetizado por los camarones, por lo que la concentración interna depende directamente de la cantidad que exista en la dieta. El colesterol es precursor de la vitamina D (controla la digestión y almacenamiento del Calcio) y de hormonas esteroides (hormona de la muda y las involucradas en la reproducción).

Entre los carbohidratos, la glucosa es fuente de energía y es necesaria para la formación de la quitina, glucoproteína que forma el exoesqueleto. También se encuentra el lactato, producto del metabolismo de carbohidratos que se asocia a condiciones de estrés, por la activación del metabolismo anaerobio.

La sangre de los camarones o hemolinfa, es el tejido de transporte y uno de los principales tejidos de reserva de estos nutrimentos. Ahí se encuentran las moléculas nutricionales que son transportadas a los distintos tejidos internos por lo que pueden ser utilizadas como indicadoras del estado nutricional. Estudios recientes han demostrado el uso de algunos

metabolitos como indicadores del estado fisiológico en juveniles de *Litopenaeus vannamei* y *L. setiferus*. En esos estudios se ha observado que las proteínas sanguíneas y la glucosa fueron sensibles a al tipo de dieta suministrada (diferentes niveles de inclusión de proteínas y carbohidratos) cuando los organismos se expusieron a altas y bajas salinidades (Rosas *et al.* 2001a; Rosas *et al.* 2001b). Asimismo, se ha reportado que la glucosa, los triacilglicéridos, el colesterol y las proteínas, pueden ser utilizados como indicadores de estrés en juveniles de *L. vannamei* (Racotta y Palacios 1998), y como indicadores del estado reproductivo y calidad de larvas (Palacios, 1999).



Otro elemento presente en la hemolinfa que se ha usado como una herramienta para monitorear el estado fisiológico, es la hemocianina, macromolécula metaloproteínica. La hemocianina es un polipéptido que tiene incorporado el cobre, el cual funciona como sitio activo acarreador de oxígeno (Rainer y Brouwer, 1993; Van Holde *et al.*, 2001). Representa el 60-95% del total de proteínas en la hemolinfa de crustáceos (Djangmah 1970), y resultó ser un indicador fisiológico en animales expuestos a diferentes condiciones ambientales, como altas concentraciones de amonio (Chen y Cheng, 1993; Chen *et al.*, 1994) y nitrito (Cheng y Chen, 1999), alta y baja salinidad (Gilles, 1977; Boone y Schoffeniels, 1979), hipoxia (Hagerman, 1986), diferentes niveles de inclusión de carbohidratos/proteínas dietéticos (Rosas *et al.*, 2001b).

Dado el creciente interés por parte de la industria del cultivo de camarones peneidos por tener herramientas de diagnóstico que permitan predecir el estado de salud de los animales en cultivo, el presente manual se ha elaborado con el objeto de poner a la disposición de cultivadores, estudiantes y profesionales, una serie de métodos estandarizados para la evaluación de diversos componentes sanguíneos. En estos métodos se incluyen diversos aspectos que intervienen en la correcta evaluación de los componentes sanguíneos, como son el manejo de los animales, la identificación de los estadios de muda, y la forma en que se deben procesar los datos.

• MANEJO DE LOS ORGANISMOS

Material

- Termómetro
- Recipiente con agua del medio (hielera, cubeta, tara)
- Aditamento para bajar la temperatura (hielo o placa congelante, en bolsa perfectamente sellada)¹
- Red con mango

El manejo de los animales antes de la toma de muestras de sangre es un aspecto crucial en este tipo de análisis. Esto se debe a que la manipulación en sí misma puede alterar de manera significativa los componentes sanguíneos. Por esta razón, previo a la extracción de la sangre (hemolinfa), los camarones se deben introducir en un baño frío (5 °C por debajo de la temperatura inicial) con el fin de disminuir el metabolismo. Esta medida previene el que algunos de los metabolitos plasmáticos, como la glucosa y el lactato, sean alterados rápidamente por la manipulación.

Prepare el recipiente (hielera, cubeta, tara) en donde van a ser transportados los organismos antes de la extracción de la hemolinfa. Llene el recipiente a la mitad con agua en la que se han mantenidos los camarones, y tome la temperatura. Posteriormente introduzca el hielo en la bolsa sellada manteniéndolo hasta que la temperatura haya disminuido 5 °C por debajo del registro inicial. Los camarones son capturados con la red de mango, tratando de evitar una manipulación excesiva. Si por alguna razón los animales llegan a saltar fuera de la red, es necesario descartarlos.

Es importante considerar el volumen del recipiente donde van a transportarse los animales, porque la densidad genera disminución de oxígeno, estrés, y por lo tanto, alteraciones en los indicadores sanguíneos. Para el caso de un muestreo realizado en un laboratorio, se recomienda utilizar una hielera de 5 l de capacidad, llena a la mitad con agua del medio, con una densidad de 5-15 animales (dependiendo del tamaño de los organismos).



¹ El uso de una bolsa perfectamente sellada es para impedir posibles fugas que llegarán a modificar las características del agua en la que los camarones han sido mantenidos.

En el caso de realizar el muestreo de un estanque de cultivo utilice una tara de plástico con 10 L de agua del estanque. En esta tara se podrán colocar 20-30 juveniles.

Una vez que se tienen los camarones en el recipiente, la transportación al lugar donde se van a llevar cabo las evaluaciones, debe ser cuidadosa y sin sobresaltos. Si el recipiente cuenta con tapa, como sería el caso de una hielera, ésta debe quitarse al momento de llegar al lugar del muestreo para que los organismos se acondicionen al cambio de intensidad de luz ambiental. Después de 5 minutos de permanencia en este recipiente, se puede realizar la extracción de la sangre.

- **OBTENCIÓN DE HEMOLINFA**



Material

- Jeringa hipodérmica desechable de 1 ml con aproximadamente 100 μL de SIC-EDTA (2-8 $^{\circ}\text{C}$)
- Un pedazo de tela aproximadamente 30 cm x 30 cm (franela de algodón).
- Parafilm (cuadros de 5 x 5 cm).
- Placa congelante
- Red con mango

Pasados los cinco minutos, es decir, una vez que los animales han sido acondicionados al ambiente de baja temperatura y de luz ambiental, es posible tomar las muestras de sangre. Al momento de extraer al animal, debe cuidarse el alterar lo menos posible a los que quedan en la tara/hielera. Como primer paso, es necesario secar perfectamente al organismo para evitar un posible contacto entre la hemolinfa y el agua. Si durante la manipulación el animal cae, debe sustituirse porque algunos metabolitos, como la glucosa y el lactato, se alteran rápidamente.

Para extraer la sangre deberá utilizar una jeringa desechable hipodérmica (de 1 ml con aguja ultrafina de 29G x 13 mm para juveniles menores de 4g, y con aguja 25G x 16 mm para mayores de 4 g; 3 ml para reproductores). La jeringa deberá contener aproximadamente 100 μL de

solución anticoagulante fría (2-8 °C) (solución isotónica para camarón, SIC-EDTA)(Anexo 1) (Vargas-Albores *et al.*, 1993).

Justo antes de la extracción de sangre, la solución anticoagulante debe descartarse completamente. La hemolinfa se extrae del seno ventrolateral del abdomen con ayuda de la jeringa. La aguja se inserta suavemente a través de la membrana artrodial de la quinta pata, para tener acceso al seno. Lentamente se desliza la aguja y, al mismo tiempo, se retira suavemente el émbolo de la jeringa, de tal forma que al momento en que la aguja entre en contacto con la sangre ésta pueda fluir hacia la jeringa. Esta acción permitirá que no se formen burbujas en la hemolinfa, evitando así que se acelere el proceso de coagulación, y con ello, la alteración de los componentes sanguíneos.



Inmediatamente después de ser extraída la hemolinfa, se deposita sobre un trozo de parafilm nuevo (no debe ser tocado con los dedos del lado donde se va a depositar la hemolinfa), el cual debe estar colocado sobre un recipiente plano frío (hielo sólido embolsado, placa congelante).

Es importante resaltar que una vez que la hemolinfa es depositada en el trozo de parafilm, el procedimiento de la toma de muestra para las diferentes evaluaciones de los componentes sanguíneos, debe ser de una manera rápida y lo más simultáneamente posible, para evitar el proceso de coagulación. Si se observan cambios en la hemolinfa, tales como la formación de grumos o una consistencia gelatinosa, es preciso descartar la muestra.

• EVALUACIÓN DE LOS INDICADORES SANGUÍNEOS

Es necesario considerar que el volumen total de hemolinfa que debe ser obtenido es de 65 μL . Este volumen se separará de la siguiente manera: 1) para el análisis de la hemocianina se requieren 10 μL , 2) para el análisis de los cinco metabolitos sanguíneos se requieren 55 μL (glucosa, lactato, colesterol, acilglicéridos y proteínas). Así, se deberá procurar obtener como mínimo ése volumen, aunque se recomienda obtener un mayor volumen.

HEMOCIANINA

Material

- Micropipeta de 2 - 20 μL ²
- Micropipeta de 100 - 1000 μL ²
- Puntas para micropipeta
- Vaso de precipitado de 50 ml con Agua destilada
- Cubetas Ultravioleta (UV) para espectrofotómetro
- Papel secante suave (que no deje pelusa).

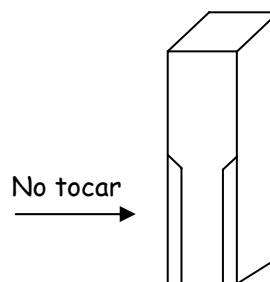
Equipo

- Espectrofotómetro con lámpara de luz Ultra Violeta (Absorbancia 335 nm)



Se coloca una cubeta de 1 ml en el espectro la cual deberá contener 990 μL de agua destilada. El espectro deberá estar encendido y colocado en una longitud de onda de 335 nm. Debe asegurarse el que la lámpara de UV se encuentre activada por lo menos 30 minutos antes de su uso.

Se calibra el espectro a 0 de absorbancia con la cubeta conteniendo 990 μL de agua destilada. Se debe tener cuidado de no tocar con los dedos los lados de la cubeta UV por donde el espectrofotómetro lee la absorbancia, y de limpiarla con un papel suave (que no deje pelusa) antes de meterla al espectrofotómetro.



² Existen diversos modelos de micropipetas con diferentes opciones de volumen. Se recomienda usar una micropipeta en la que el volumen requerido caiga dentro de los valores medios del rango que maneja la micropipeta. Una excepción es cuando se requiere un volumen de 1000 μL .

Se toman 10 μL de hemolinfa con una micropipeta adecuada y se mezclan con los 990 μL de agua destilada. La mezcla se logra al succionar y pulsar varias veces el contenido de la punta de la micropipeta. Una vez hecho esto, se revisa que la cubeta no contenga burbujas, ni marcas de dedos, y se coloca en el espectro. Se lee la absorbancia tal y como lo hizo cuando calibró a cero con el agua destilada. Anote el valor obtenido. Este análisis debe hacerse por duplicado. En cada análisis se cambia el agua de la cubeta, se enjuaga dos veces con agua destilada, se seca con papel suave y se repite la operación.

Cálculo

La concentración de hemocianina (H_c) se calcula utilizando el coeficiente de extinción $\epsilon = 17.26$. Ejemplo: Se tiene un valor de absorbancia de 0.235.

$$H_c = (0.235/17.26) \times \text{FD}$$

Donde FD es el factor de dilución. Si se utilizaron 10 μL en 990 μL entonces $1000/10 = 100$. Por lo tanto:

$$H_c = (0.235/17.26) \times 100 = 1.36 \text{ mmol/L}$$

- METABOLITOS
- Obtención de plasma

Material

- Tubos Eppendorf (1.5 ml) conteniendo 110 μL de SIC-EDTA (2-8 $^{\circ}\text{C}$)
- Tubos Eppendorf (1.5 ml) nuevos
- Recipiente frío (0 $^{\circ}\text{C}$)
- Micropipeta 20 - 200 μL
- Puntas para micropipeta

Equipo

- Centrífuga refrigerada

Los metabolitos plasmáticos no se evalúan directamente en la hemolinfa, sino que es necesario diluirla en solución anticoagulante (SIC-EDTA): por cada volumen de hemolinfa se requieren dos de SIC-EDTA. Por ejemplo, si se desean cuantificar los cinco metabolitos, se deben diluir 55 μL de hemolinfa en 110 μL de SIC-EDTA (Anexo 2).

En el caso de que se quieran analizar los cinco metabolitos, se requerirán tubos Eppendorf (1.5 ml) previamente llenados con 110 μL del SIC-EDTA (2-8 $^{\circ}\text{C}$) y marcados de forma numérica progresiva con plumón indeleble (uno por cada muestra de camarón). Se toman 55 μL de la muestra de hemolinfa y se mezclan con el anticoagulante en el tubo Eppendorf. Ya con la hemolinfa diluida, los tubos Eppendorf se centrifugan a 800 g por 3 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras con hemolinfa + SIC-EDTA pueden refrigerarse hasta una hora, antes de ser centrifugadas.



Después de centrifugar, a los tubos se les retira el sobrenadante (plasma + SIC-EDTA), introduciendo lentamente la punta de la micropipeta sin tocar el fondo, donde es posible observar el paquete celular, el cual para este tipo de análisis no interesa. El sobrenadante se deposita en tubos Eppendorf nuevos y marcados con la misma secuencia de números que se siguió para las muestras de sangre. En este caso, la cantidad de plasma + SIC-EDTA recuperado debe ser de aproximadamente 165 μL .

Una observación importante es que los tubos con el plasma siempre deben mantenerse en una temperatura de 2-8 $^{\circ}\text{C}$. Aunque se aconseja realizar las evaluaciones plasmáticas en fresco, se ha observado que el plasma puede mantenerse hasta por 36 horas en 2-8 $^{\circ}\text{C}$ sin alteraciones importantes de la concentración de los componentes sanguíneos. En el anexo 3 se proporcionan los valores obtenidos para cada uno de los metabolitos, a diferentes tiempos de preservación de muestras refrigeradas (2-8 $^{\circ}\text{C}$) y congeladas (-40 $^{\circ}\text{C}$), los cuales puede ser usados como referencia en caso de que se requiera analizar muestras almacenadas.

• CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS EN EL PLASMA

La cuantificación de la glucosa, lactato, colesterol, acilglicéridos y proteínas, se llevan a cabo con Kits comerciales con los cuales se evalúan colorimétricamente reacciones enzimáticas, las cuales producen cambios de color diferencial en respuesta a varias concentraciones de los metabolitos.

• glucosa

La glucosa es transformada por la glucosa oxidasa, en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de peroxidasa, oxida el sistema cromógeno (4-aminofenazona/fenol) convirtiéndolo en un compuesto de color rosa.

- lactato

El ácido láctico es convertido a piruvato y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la lactato oxidasa. En la presencia del H_2O_2 formado, la peroxidasa cataliza la condensación oxidativa de cromógenos que producen un color violeta.

- colesterol

Los ésteres del colesterol son hidrolizados por la colesterol éster hidrolasa para liberar colesterol y ácidos grasos. El colesterol libre existente, conjuntamente con el producido por esta reacción, es oxidado por la colesterol oxidasa a Δ^4 -colesteno y peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el sistema cromógeno (4-aminoantipirina/fenol) en un compuesto de color rosa.

- acilglicéridos

El glicerol liberado en la hidrólisis de los triglicéridos, por la acción de la lipoproteín-lipasa, se convierte, mediante la glicerol-quinasa, en glicerol-3-fosfato, que se oxida por la glicerol-fosfato oxidasa en dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. Ante la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida al cromógeno 4-aminoantipirina/p-clorofenol, en un compuesto de color violeta.

- proteínas

Se determina la concentración de proteína solubilizada a través de color ácido. El Azul Coomassie se liga a los amoniácidos primariamente básicos y aromáticos, especialmente la arginina. La absorbancia máxima para la solución ácida de Azul Coomassie ocurre de 465-595 nm cuando sucede el enlace con proteínas.

- Uso de los kits

Los kits de glucosa (Bayer-Sera-Pak Plus B01 4509-01), colesterol (Bayer- Sera-Pak Plus B01 4507-01), y acilglicéridos (Bayer- Sera-Pak Plus B01 4551-01), cuentan con el reactivo listo para ser usado. Sin embargo, con respecto al lactato y las proteínas, el procedimiento cambia. En el lactato (Sigma 735-10), se requiere adicionar al frasco con el polvo reactivo, 10 ml de agua libre de pirógenos (agua estéril, la cual puede encontrarse en las farmacias como agua inyectable).

Para las proteínas, es necesario diluir el reactivo (proteína BIO-RAD-500-0006) en agua libre de pirógenos, en una proporción de 1:4. Por ejemplo, si se desean preparar un total de 250 ml, se necesitan diluir 50 ml del reactivo madre en 200 ml de agua estéril, y posteriormente, pasarse a través de un filtro Whatman (0.2 μ diámetro de poro), con ayuda de una bomba de vacío.



Antes de realizar las evaluaciones, es importante verificar la fecha de caducidad que viene marcada en la etiqueta externa del kit, y una vez preparado el reactivo, marcar la fecha de preparación y caducidad³. Es necesario mantener los reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Tabla 1).

• Procedimiento de evaluación

Material

- Tubos Eppendorf con el plasma en recipiente frío
- Tubos Eppendorf con 1000 μ L de agua estéril
- 5 Vasos de precipitado de 20-50 ml
- Micropipeta 10-20 μ L
- Puntas para micropipeta
- Micropipeta de repetición (200 μ L)
- 5 Puntas para micropipeta de repetición
- Placas para lector de ELISA
- Sol. reactiva de glucosa, lactato, colesterol, acilglicéridos, proteínas
- Curvas patrón de glucosa, lactato, colesterol, acilglicéridos, proteínas
- SIC-EDTA y agua estéril (el volumen requerido depende del número de microplacas que se usarán, pero aproximadamente son 150 μ L para el SIC, y 50 μ L para el agua estéril)

Equipo

- Lector de ELISA

Después de obtener el plasma, el siguiente paso se lleva a cabo en una microplaca para lector de ELISA, y consiste en adicionar en cada pozo de la misma:

³ Si el reactivo preparado excede los 100 ml, como es el caso de la glucosa, colesterol, acilglicéridos y pudiera ser el de las proteínas, se recomienda vaciarlo en un contenedor de menor tamaño para usarlo como reactivo de trabajo y así evitar cualquier contaminación. Si existe cualquier duda de contaminación, es preferible descartarlo.

10 μ L muestra + 200 μ L reactivo $\xrightarrow{\text{tiempo de incubación}}$ lectura en lector de ELISA

Se colocan 10 μ L de la muestra de plasma en un pozo (de cada muestra se realizan tres repeticiones). Posteriormente, se añaden 200 μ L de solución reactiva (Kit). Si se tiene al alcance una pipeta de repetición, esta puede ayudar a reducir el tiempo empleado en el llenado de los pozos de la microplaca, sobretodo si se considera que la evaluación colorimétrica de cada uno de los metabolitos, tiene un límite de tiempo de incubación, mismo que es necesario medir con precisión. (Tabla 1).



Tabla 1. Uso de reactivos

* Reactivo	Tiempo de la reacción (min)	Estabilidad de la reacción ⁴ (min)	Longitud de onda (nm)	Tiempo de caducidad del reactivo preparado
Glucosa	10	60	540	La fecha que indica la caja, manteniéndolo en 2-8 °C y protegido de la luz
Lactato	10	10	540	8 horas 18-26 °C; 7 días 2-8 °C; 30 días congelado
Colesterol	5	60	540	La fecha que indica la caja, manteniéndolo en 2-8 °C y protegido de la luz
Acilglicéridos	10	60	540	La fecha que indica la caja, manteniéndolo en 2-8 °C y protegido de la luz
Proteínas	5	60	595	60 días 4 °C; 2 semanas 15-25 °C

* Atemperar el reactivo antes de usarlo

⁴ Estabilidad de la reacción: Se refiere al tiempo posterior de la reacción en el cual el color permanece estable. Debe respetarse el tiempo de la reacción para que las evaluaciones de diferentes muestras sean comparables, por lo cual se recomienda que en cada corrida lleve a cabo una bitácora de procedimiento.

Es importante mencionar que para la evaluación de las proteínas, se requiere tomar 10 μL de la muestra del plasma y diluirlos, bien mezclados, en 1000 μL ⁵ agua destilada. Esta operación la puede llevar a cabo en un tubo Eppendorf nuevo (1.5 ml).

Antes de finalizado el tiempo de incubación de la reacción, debe estar preparado el lector de ELISA con la longitud de onda que corresponde a la determinación de cada metabolito (Tabla 1).



Además de las muestras de plasma que se van a evaluar, se deben adicionar en la microplaca, un blanco y una curva patrón para cada metabolito. Si el conjunto de evaluaciones excede los pozos de una microplaca, debe de repetirse el blanco en la nueva microplaca. Si no se cuenta con un lector de ELISA, las evaluaciones se pueden realizar en un espectrofotómetro convencional, siguiendo los pasos que marca el instructivo para cada kit clínico.

El considerar un blanco permite eliminar la absorbancia que presentan las sustancias ajenas a la reacción colorimétrica del metabolito con el reactivo. En el caso específico de la glucosa, el lactato, el colesterol, y los acilglicéridos, el SIC-EDTA es el blanco, y para las proteínas, es el agua destilada (debido a la dilución 1:101 que se llevo a cabo en el agua destilada con la muestra de plasma).

La curva patrón es un procedimiento técnico indispensable que permite cuantificar la concentración total final de cada uno de los metabolitos, pero que además permite valorar la estabilidad de los reactivos del Kit. Por ello, es necesario hacer una curva patrón para cada uno de los metabolitos al momento de llevar a cabo las evaluaciones en la placa.

En la tabla 2 se presenta la relación de concentraciones requeridas y las diluciones a preparar para cada curva patrón. Estas concentraciones deben llevarse a cabo con la solución estándar de cada metabolito. Esta solución no es más que el sustrato sobre el cual actúan las enzimas contenidas en la solución reactiva de los kits. Los kits de glucosa, colesterol y acilglicéridos, cuentan con la solución estándar. Sin embargo, en los casos de las proteínas y el lactato, la solución estándar se adquiere aparte. Para las proteínas es albúmina bovina (Sigma A-7906 o

⁵ Aunque el factor de dilución que se estipula en el procedimiento técnico es 1:100, es decir, 10 μl de plasma en 990 μl de agua destilada, se puede usar un factor de dilución de 1:101 (10 en 1000), para facilitar el llenado de los tubos con agua destilada usando una pipeta de repetición.

Pierce-23209, éste último viene específicamente en la concentración deseada); y para el lactato, la solución de referencia tiene el número de catálogo: Sigma 826-10.

En el anexo 4 se proporciona un ejemplo de plantilla sobre la cual se coloca la microplaca lectora, lo que resulta muy útil para evitar errores de confusión a la hora de ir dispensando cada una de las diferentes tipos de muestras (blanco, curva patrón, muestras de plasma). Asimismo, se proporciona una propuesta de bitácora de procedimiento que permite llevar un registro por cada muestreo, y que puede servir como referencia, por si hay algún cambio en el procesamiento de muestras.

Tabla 2. Diluciones curvas patrón.

Metabolito y concentración de solución estándar	Concentración de sol. estándar en curva patrón mg ml ⁻¹	Volumen de Solución estándar μL		Volumen de Agua destilada μL	Volumen final μL
Glucosa 1 mg ml ⁻¹	0.05	25	+	475	500
	0.1	50	+	450	500
	0.2	100	+	400	500
	0.5	250	+	250	500
	0.7	350	+	150	500
	1	500	+	-	500
Lactato 0.4 mg ml ⁻¹	0.01	12.5	+	487.5	500
	0.05	62.5	+	437.5	500
	0.1	125	+	375	500
	0.2	250	+	250	500
	0.3	375	+	125	500
	0.4	500	+	-	500
Colesterol 2 mg ml ⁻¹	0.1	25	+	475	500
	0.2	50	+	450	500
	0.5	125	+	375	500
	1	250	+	250	500
	1.5	375	+	125	500
	2	500	+	-	500
Triacilglicéridos 2 mg ml ⁻¹	0.1	25	+	475	500
	0.3	75	+	425	500
	0.5	125	+	375	500
	1.0	250	+	250	500
	1.5	375	+	125	500
	2.0	500	+	-	500
Proteínas 2 mg ml ⁻¹	0.05	12.5	+	487.5	500
	0.1	25	+	475	500
	0.2	50	+	450	500
	0.5	125	+	375	500
	0.7	175	+	325	500
	1.0	250	+	250	500

Cada concentración se prepara en tubo Eppendorf (500 μL), y se agita vigorosamente. Deben mantenerse en frío (2-8 °C).

- Cálculos

Como primer paso, es necesario llevar a cabo una regresión lineal⁶ con los valores promedio obtenidos en la curva patrón. Se espera que los valores de las densidades ópticas obtenidas en cada una de las concentraciones consideradas en la curva patrón, sean directamente proporcionales al aumento en la concentración del estándar. Por ello, al correr la regresión, se tiene que verificar el índice de correlación (0.97), y el valor de significancia de la regresión ($p \leq 0.05$). En caso de que el valor de correlación sea menor a 0.97, se requiere hacer una nueva curva patrón.

Una vez verificado el comportamiento de los datos, entonces los valores del intercepto y de la pendiente pueden utilizarse en el cálculo de la concentración final a partir de la ecuación de la recta:

$$y = a + bx$$

donde:

a= intercepto; b= pendiente; x= concentración (mg ml⁻¹); y= valores de densidad óptica (DO)

Entonces:

$$\text{Concentración} = ((\text{DO muestra} - \text{DO blanco}) - (\text{intercepto}) / \text{pendiente}) (\text{FD})$$

DO = Densidad óptica (valores promedio)

FD= Factor de dilución

glucosa, lactato, colesterol, y acilglicéridos:

3 (el volumen de la hemolinfa se diluyó en dos volúmenes de SIC-EDTA)

proteínas:

3 x 110 (el volumen de la hemolinfa se diluyó en dos volúmenes de SIC-EDTA y el volumen de la muestra de plasma se diluyó 110 veces en agua estéril)

La concentración para todos los metabolitos (glucosa, lactato, colesterol, acilglicéridos y proteínas) se expresa en mg ml⁻¹.

Como ejemplo de estos cálculos, a continuación se presenta el procesamiento de datos de proteínas, capturados y analizados en una hoja de cálculo de EXCELL, obtenidos en un muestreo llevado a cabo en juveniles de camarón (*L. setiferus*).

⁶ Este cálculo se puede realizar en EXCEL, en el comando de herramientas/análisis de datos/regresión/ rango y de entrada (promedio de densidad óptica de las muestras en cada una de las diluciones de la curva patrón)/rango x de entrada (Concentración de cada una de las diluciones de la curva)/rango de salida/curva de regresión ajustada.

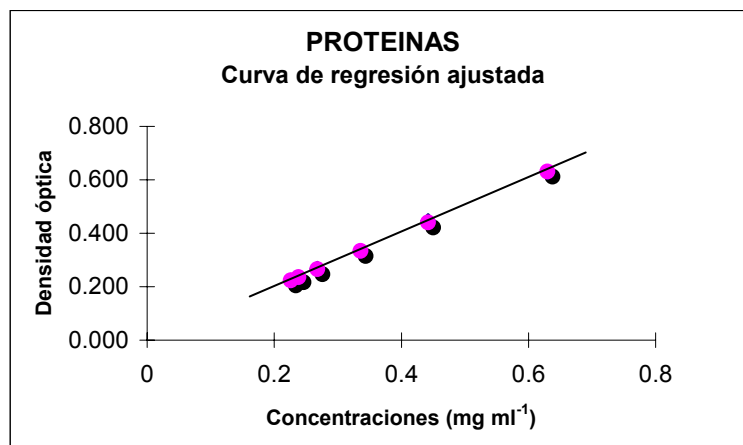
- Valores obtenidos en curva patrón de proteínas

Concentraciones Curva patrón (mg ml ⁻¹)	Densidad óptica Repeticiones		Promedio
0.02	0.226	0.22	0.223
0.05	0.238	0.232	0.235
0.1	0.268	0.265	0.267
0.2	0.336	0.33	0.333
0.5	0.442	0.45	0.446
1.0	0.63	0.627	0.629

Es importante mencionar que sólo se tienen dos repeticiones por considerar que después de la aplicación continua del procedimiento el margen de error en el pipeteo disminuye.

- Verificación estadística y comportamiento matemático de los valores obtenidos en la curva patrón

VERIFICACIÓN ESTADÍSTICA Y MATEMÁTICA	
ESTADÍSTICAS DE LA REGRESIÓN	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999876
ANÁLISIS DE VARIANZA	
Valor crítico de F	0.0001
INTERCEPTO	-0.0039
VARIABLE X 1 (pendiente)	1.0072



- Procesamiento final, considerando la sustitución de los datos obtenidos en la ecuación de la recta.

	Densidad óptica			Promedio	DO-blanco (valores promedio)	(DO-intercepto)/ pendiente	Multiplicado por FD = Proteínas (mg ml ⁻¹)
	R e p e t i c i o n e s						
Blanco	0.223	0.213	0.212	0.216			
Muestra							
1	0.891	0.897	-	0.894	0.678	0.682	225.06
2	0.894	0.902	-	0.898	0.682	0.686	226.38
3	0.728	0.702	-	0.715	0.499	0.503	165.99
4	0.620	0.675	-	0.648	0.432	0.435	143.55
5	0.680	0.659	-	0.670	0.454	0.457	150.81
6	0.880	0.862	-	0.871	0.655	0.659	217.47
7	0.812	0.822	-	0.817	0.601	0.605	199.65
8	0.792	0.770	0.790	0.784	0.568	0.572	188.76
9	0.597	0.592	-	0.595	0.379	0.382	126.06
10	0.867	0.849	0.832	0.849	0.633	0.637	210.21

Intercepto = -0.0039

Pendiente = 1.0072

FD = Factor de dilución (330)

- = valores desechados

Para la evaluación de proteínas, se recomienda hacer tres repeticiones debido a la dilución de 10 μL de plasma en los 1000 μL de agua estéril, lo que aumenta la posibilidad de error. Como se observa en esta tabla, en varios casos sólo se tienen dos repeticiones, en los cuales se decidió eliminar uno de los valores por estar alejado de los otros dos.

ESTADIO DE MUDA

Material

- Tijeras
- Porta y cubre objetos

Equipo

- Microscopio óptico

La muda (ecdysis) en los camarones es un fenómeno cíclico y cada ciclo está claramente establecido por el desprendimiento del caparazón viejo (exoesqueleto o exuvia). Antes y después de la ecdysis, ocurren los mayores eventos metabólicos asociados específicamente con

el crecimiento, y en los cuales se incluyen la degradación del viejo exoesqueleto y la síntesis de un nuevo exoesqueleto.

En general, los estadios que integran el ciclo de la muda son: postmuda (A, B), intermuda (C) y premuda (D). En cada uno de estos estadios, la concentración de metabolitos presentes en la hemolinfa varía de acuerdo a los cambios metabólicos necesarios para que se realice el proceso de ecdisis. Por esto, resulta necesario caracterizar el estadio de muda de cada uno de los camarones muestreados, y considerar sólo aquellos que se encuentren en intermuda (C).

Una forma de caracterizarlos es a través de la identificación visual microscópica de los cambios estructurales secuenciales en la epidermis de los urópodos, y en la cual se toma en cuenta :

- el grado de retracción epidermal de las bases setales considerando la ausencia o presencia de la matriz celular
- la retracción epidermal de la cutícula junto con el desarrollo de las nuevas setas

A continuación se representan esquemáticamente los cambios estructurales en la epidermis de los urópodos que ayudan a la identificación de los diferentes estadios de muda, y donde además se mencionan los eventos metabólicos que ocurren en cada uno de ellos. En el esquema se señalan los urópodos que pueden ser disecados para su evaluación. Una vez disecado el urópodo, se coloca en el portaobjetos con una gota del agua del medio en la que se transportaron los animales, se pone el cubreobjetos, y se observa en el microscopio óptico en 10 y 40x.

- ANEXO 1

- Preparación del anticoagulante: Solución isotónica para camarón (SIC-EDTA)

Material

- Espátula
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Matraz aforado de 500 ml
- Agua libre de pirógenos 500 ml
- Micropipeta 1ml
- Barra magnética (mosca)
- Puntas para micropipeta
- Agua destilada
- Botella estéril de 500 ml
- Papel sanitario

Equipo

- Balanza analítica
- Medidor de pH
- Agitador magnético

Reactivos

Compuesto	Peso Molecular	mM	gramos para 500 ml
Cloruro de Sodio (NaCl)	58.44	450	13.145
Cloruro de Potasio (KCl)	74.55	10	0.37275
Hepes	238.3	10	1.1925
EDTA.Na ₂	372.2	10	1.861

Después de pesar cada uno de los reactivos en las cantidades calculadas, se incorporan, uno por uno, en 400 ml de agua estéril contenida en el vaso de precipitado el cual debe estar en el agitador magnético con la barra magnética. Este procedimiento asegura la completa disolución de los reactivos. Se recomienda no disolverlos en el volumen total que se desea preparar porque después del ajuste del pH, el vaso de precipitado en donde se llevo a cabo la disolución debe enjuagarse con un poco de agua estéril (menos de 100 ml).

Una vez completada la disolución, se ajusta el pH a 7.3 y después se vacía el contenido en el matraz aforado de 500 ml. Al ajustar el pH, si los valores son mayores a 7.3 debe adicionarse gota a gota Ácido Clorhídrico concentrado (HCl); si por el contrario, está por abajo, se adicionará, también gota a gota, Hidroxido de Sodio 10 M (NaOH)

Se enjuaga el vaso de precipitado como ya se mencionó, y se completa el volumen de 500 ml. Finalmente, la solución se filtra a través de un acrodisco de 0.2 μm con ayuda de una jeringa de 20 ó 50 ml, o bien, se filtra con ayuda de una bomba de vacío a través de un filtro de 0.2 μm nuevo, como se explicó en la preparación del reactivo de proteínas.



Todo el material de plástico y cristalería debe estar estéril o lavado con un jabón especial que elimina endotoxinas (E-TOXA-Clean Sigma-210-3).

- ANEXO 2
- Volúmenes requeridos de acuerdo al número de metabolitos a evaluar

Número metabolitos	Volumen requerido de plasma+SIC-EDTA	Hemolinfa	SIC-EDTA	Volumen Total: hemolinfa+SIC-EDTA
1	30 μ L (3 repeticiones, cada una de 10 μ L)	15 μ L	30 μ L	45 μ L*
2	60 μ L (3 repeticiones, cada una de 10 μ L)	25 μ L	50 μ L	75 μ L*
3	90 μ L (3 repeticiones, cada una de 10 μ L)	35 μ L	70 μ L	105 μ L*
4	120 μ L (3 repeticiones, cada una de 10 μ L)	45 μ L	90 μ L	135 μ L*
5	150 μ L (3 repeticiones, cada una de 10 μ L)	55 μ L	110 μ L	165 μ L*

Los valores de la columna Volumen total de hemolinfa + SIC-EDTA permiten que cada metabolito sea medido por triplicado. El excedente de 15 μ L garantiza poder contar con un volumen mínimo requerido para hacer los análisis.

- ANEXO 3

- Tiempo de almacenamiento

Los valores en mg ml^{-1} , corresponden al promedio de 10 muestras de machos adultos de *L. setiferus* mantenidos por un mes en cautiverio. Se presentan el error estándar (ES) y las diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tiempos de preservación de las muestras para cada uno de los metabolitos.

En ninguno de los casos, tanto en las muestras preservadas en refrigeración y congelamiento, se presentan diferencias significativas entre los tiempos de preservación. Sin embargo, se recomienda realizar las evaluaciones lo más inmediato posible (hasta 36 hr), ya que se observan algunos cambios en los valores de los componentes lipídicos. En caso de requerir preservación (frío o congelación), es preferible que a todas las muestras, aún de diferentes monitoreos, se manejen de igual manera antes de ser evaluadas.

Refrigeración (2-8 °C)									
	1 día		3 días		5 días		8 días		
	mg ml^{-1}	ES	mg ml^{-1}	ES	mg ml^{-1}	ES	mg ml^{-1}	ES	
Acilglicéridos	0.809	± 0.125 ^a	0.928	± 0.141 ^a	0.944	± 0.139 ^a	0.901	± 0.128 ^a	
Lactato	0.123	± 0.017 ^a		±		±	0.145	± 0.014 ^a	
Colesterol	0.370	± 0.061 ^a	0.420	± 0.061 ^a	0.434	± 0.066 ^a	0.431	± 0.06 ^a	
Glucosa	0.261	± 0.033 ^a	0.264	± 0.038 ^a	0.285	± 0.039 ^a	0.264	± 0.024 ^a	
Proteínas	365.07	± 11.39 ^a	319.07	± 11.3 ^a	339.88	± 5.52 ^a	348.08	± 6.65 ^a	

Congelamiento (-40 °C)				
	3 días		8 días	
	mg ml^{-1}	ES	mg ml^{-1}	ES
Acilglicéridos	0.700	± 0.124 ^a	0.813	± 0.136 ^a
Lactato			0.137	± 0.018 ^a
Colesterol	0.384	± 0.048 ^a	0.406	± 0.062 ^a
Glucosa	0.205	± 0.023 ^a	0.215	± 0.031 ^a
Proteínas	326.84	± 7.84 ^a	325.24	± 16.39 ^a

- ANEXO 4

- Ejemplo de Plantilla

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	1	1	1	9	9	9			
B	S1	S1	S1	2	2	2	10	10	10			
C	S2	S2	S2	3	3	3						
D	S3	S3	S3	4	4	4						
E	S4	S4	S4	5	5	5						
F	S5	S5	S5	6	6	6						
G	S6	S6	S6	7	7	7						
H				8	8	8						

B= Blanco

S1-S6= Curva estándar

1-10= número de muestra

- Bitácora

Metabolito	Entrada	Tiempo de la reacción (min)	Salida	Estabilidad de la reacción (min)	Longitud de onda (nm)	Observaciones
Glucosa		30		30	540	
Colesterol		15		30	540	
Acilglicéridos		10		30	540	
Lactato		10		10	540	
Proteína		5		60	595	

• Referencias bibliográficas

- Barnabé, G. Bases Biológicas y ecológicas de la acuicultura. Edit. Acribia. 1ª. Edic., 1996. Zaragoza, España. 519 pp.
- Boone W.R. y Schoffeniels E. 1979. Hemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 207-214.
- Chen, J-Chu, Sha.-Y, Cheng. 1993. Hemolymph PCO₂, Hemocyanin, protein levels and urea excretion of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquatic Toxicology* 27: 281-292.
- Chen, J-Chu, Sha.-Y, Cheng, y Chung-T, Chen 1994. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A (2): 339-347.
- Cheng, Sha-Y y J-Chu, Chen. 1999. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite. *Aquatic Toxicology* 45: 35-46.
- Djangmah, J.S. 1970. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). *Comp. Biochem. Physiol.* 32: 709-731.
- Gilles, R. 1977. Effects of osmotic stress on the protein concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A:109-114.
- Hagerman, L. 1986. Haemocyanin concentration on *Crangon crangon* (L.) after exposure to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A:721-724.
- Palacios, E.M. 1999. Caracterización fisiológica del agotamiento reproductivo y optimización de la producción del camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) Tesis Doctoral. CIBNOR. México
- Racotta, I.S. and Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.* 29: 351-356.
- Rainer, J y M. Brouwer. 1993. Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B (1):69-73.
- Robertson, L. Bray, W., Leung-Trujillo, J. y Lawrence, A.L. 1987. Practical Molt Staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aquac. Soc.* (18)3:180-185.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., LePriol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sánchez, A., and Van Wormhoudt, A. 2001a. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 259: 1-22.

Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., and van Wormhoudt, A. 2001b. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda ; Penaeidae). *Aquac. Res.* 32: 1-20.

Van Holde, K., K. Miller, y H. Decker (2001) Hemocyanins and Invertebrate Evolution. *J. Biol. Chem.* 276 (19):15563-15566

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