

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



PROGRAMA DE DOCTORADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

**ONTOGENIA DE LA CAPACIDAD OSMORREGULADORA DEL
CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI***

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR en CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JENNYFERS CHONG ROBLES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. MAYO DE 2015.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



PROGRAMA DE DOCTORADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

**ONTOGENIA DE LA CAPACIDAD OSMORREGULADORA DEL
CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI***

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR en CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JENNYFERS CHONG ROBLES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. MAYO DE 2015.

Resumen

La capacidad de un organismo para sobrevivir en diferentes salinidades (o eurihalinidad) es una adaptación evolutiva de los crustáceos que les permite mantener “estable” la osmolalidad de la hemolinfa dentro de los límites de sus patrones osmorreguladores. Las especies eurihalinas poseen mecanismos adaptativos que incluyen estructuras y epitelios con células especializadas llamadas ionocitos, las cuales poseen una ultraestructura muy característica y cuentan con un mecanismo molecular especializado para el transporte iónico en el que la ATPasa Na^+/K^+ es fundamental. Los juveniles y adultos del camarón blanco *L. vannamei* son eurihalinos hiper-hiposmorreguladores, y sin duda estas capacidades las adquieren progresivamente durante su ontogenia. El desarrollo de *L. vannamei* consta de varias etapas, sin embargo, no existe suficiente información sobre el momento en el que se desarrollan las capacidades osmorreguladoras. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la capacidad osmorreguladora de *L. vannamei* desde la etapa de nauplio hasta la adultez. Se evaluó la supervivencia a diferentes salinidades (5, 10, 20, 32, 45, 60 UPS) y caracterizó la topografía celular durante el desarrollo de la cámara branquial (branquiostegito, epipoditos, pleura, branquias). El desarrollo de los ionocitos se determinó mediante MET e IFI. Se evaluó la respuesta al estrés salino mediante el análisis de la expresión de la ATPasa Na^+/K^+ por qPCR y en la ultraestructura de los ionocitos de algunas etapas y salinidades. En *L. vannamei* la primer poslarva marca el inicio del patrón hiper-hiposmorregulador (patrón de osmorregulación tipo III). La cámara branquial y sus epitelios se desarrollaron progresivamente hasta completar la fórmula branquial (18 branquias y 5 epipoditos) en PL15. Las estructuras osmorreguladoras en esta especie son los branquiostegitos y epipoditos. Aunque se observaron ionocitos en los epipoditos y branquiostegitos desde PL1, no fue sino hasta en etapas poslarvales avanzadas (PL15) en que se detectó la expresión proteica de la ATPasa Na^+/K^+ . La expresión génica de la ATPasa Na^+/K^+ se observó en todas las etapas y salinidades evaluadas, posiblemente porque es una proteína multifuncional; no obstante, en algunas etapas se detectaron diferencias significativas entre las salinidades lo que indica la participación del mecanismo molecular en la osmorregulación. La salinidad modificó la ultraestructura celular del epipodito y el branquiostegito. Los resultados de este trabajo revelan que *L. vannamei* regula la osmolalidad de su hemolinfa desde etapas iniciales de su desarrollo, pero la capacidad para tolerar salinidades alejadas a su punto isosmótico depende del desarrollo de las estructuras involucradas en el transporte activo. Las capacidades osmorreguladoras observadas en este trabajo son reflejo de las adaptaciones de la especie a su hábitat natural, en donde las poslarvas (quizá a partir de PL15) se reclutan a los sistemas estuarinos, y proporcionan una primera aproximación al conocimiento básico de los mecanismos de adaptación a nivel celular y molecular de la especie en condiciones de cultivo.

Palabras clave: osmorregulación, larvas, capacidad osmótica, ATPasa Na^+/K^+ , crustáceos, reclutamiento, ecofisiología.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

ONTOGENIA DE LA CAPACIDAD OSMORREGULADORA DEL
CAMARÓN BLANCO *LITOPENAEUS VANNAMEI*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JENNYFERS CHONG ROBLES

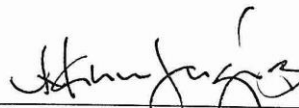
Aprobada por:



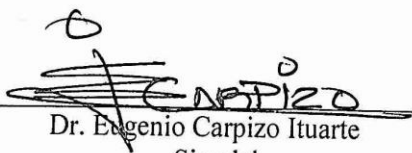
Dra. Ivone Giffard Mena
Director de tesis



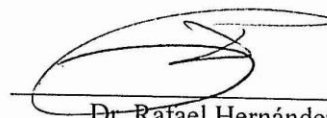
Dra. Olga Araceli Patrón Soberano
Sinodal



Dr. Luis Manuel Enriquez Paredes
Sinodal



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
Sinodal



Dr. Rafael Hernández Walls
Sinodal

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca proporcionada para la realización de mis estudios de doctorado en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

A la UABC por los apoyos brindados durante la realización del doctorado, así como a su personal académico que contribuyó a mi formación.

A la Dra. Ivonne Giffard Mena por confiar en que podría realizar el doctorado con el tema de la osmorregulación en el camarón blanco. Gracias Ivone por todas tus enseñanzas y porque siempre estuviste dispuesta a escuchar, y con calma y paciencia resolviste todas mis inquietudes.

A los Dr. Guy Charmantier y Viviane Boulo por aceptar ser parte de esta investigación como revisores externos. Gracias por sus contribuciones y enseñanzas para extraer la hemolinfa de las pequeñas larvas y cuantificar la osmolalidad. Les agradezco también su paciencia y la de su equipo para lograr una buena comunicación cuando realicé la estancia académica en la Universidad de Montpellier 2, Francia.

A los revisores de este trabajo: Dra. O. Araceli Patrón Soberano, Dr. Luis Enríquez Paredes, Dr. Rafael Walls Hernández y Dr. Eugenio Carpizo Ituarte; gracias por las contribuciones que hicieron a la tesis.

Al biólogo Joel Lizárraga (gerente general de la empresa AQUAPACIFIC, S.A. de C.V.) por su apoyo en la donación de larvas, materiales, etc. (y todo lo que necesité) para que se realizaran con éxito los experimentos en Mazatlán, Sinaloa.

Al personal de la empresa AQUAPACIFIC, S.A de C.V por su apoyo para que conociera todas las etapas larvales del camarón y ayudarme a construir el diseño experimental. En especial a Enrique Wong porque siempre estuvo pendiente de

proporcionarme a tiempo los camarones que necesité para los experimentos y para responder a cualquier duda y solucionar cualquier imprevisto.

Agradezco el apoyo técnico de la Biol. Deyanira Rodarte Villegas del Laboratorio de Histología de la Facultad de Ciencias de la UABC.

Agradezco el apoyo técnico de la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

A la Dra. María Esther Jiménez y la Dra. Martha Eugenia Santoyo del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, por facilitar el uso del ultramicrotomo Sorvall MT2.

Al Dr. Miguel Ávalos del Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología asociado a la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de la Investigación Científica y Tecnológica, por apoyar este proyecto con el uso del microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 200CX y el Microscopio Electrónico de Barrido Quanta 200.

Al Dr. Isaí Pacheco Ruíz del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC por permitirme utilizar los Microscopios del laboratorio de Macroalgas.

A la Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez del laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por permitirme utilizar el Microscopio de Epifluorescencia.

Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte responsable del Laboratorio de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC por permitirme utilizar el termociclador ABI para los análisis de qPCR.

A la Dra. Giffard le agradezco todas sus contribuciones para que la tesis y en general todo el trabajo se pudiera realizar. Gracias Ivone por siempre revisar!!...

A la Dra. Patrón le agradezco infinitamente su paciencia y disponibilidad para la realización del análisis de MET en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Asimismo agradezco al Dr. Luis Enríquez Paredes por su ayuda (quizá distrayéndolo de su trabajo) para resolver cualquier duda en el laboratorio de Ecología Molecular de la UABC.

Al departamento de servicios escolares por su apoyo y paciencia en la recepción de documentos.

Gracias Deya por tu interés y tiempo dedicado para que pudiésemos entender juntas cómo se desarrollan las estructuras y los tipos celulares de la cámara branquial del camarón.

A mis amigos de siempre, a los nuevos, a todos los compañeros del posgrado y del labo de histología. Cada momento compartido con ustedes fue siempre agradable y recargador de ánimos para seguir en esto.....

A Isabel y Martín Moctezuma por toda su confianza y apoyo que he recibido desde que llegué a Ensenada.

A mi madre y hermano, por estar siempre a mi lado, por echarme porras para que terminara esta última etapa de formación académica. Pero sobre todo, gracias Madre por el apoyo económico, definitivamente no lo hubiese logrado sin tu ayuda.

Agradezco a Dafne y Jenny porque con todo su amor y sonrisas siempre me recargan de energía para seguir adelante.

A toda mi familia chiapaneca que siempre está pendiente de mi.

Dedicatoria

☪ mi madre,

☪ mi hermano y sus grandes peques,

☪ mi padre (q.e.p.d.); quien me transmitió el interés por el mar,

...los amo.

CONTENIDO

Resumen	iii
Agradecimientos	v
Dedicatoria	viii
Lista de Figuras y Tablas.....	xi
Lista de abreviaciones	xiii
1. Introducción.....	16
<i>1.1. Osmorregulación en crustáceos: generalidades</i>	<i>17</i>
1.1.1. Patrones y capacidades osmorreguladoras en crustáceos.....	19
1.1.2. Cámara branquial de crustáceos: estructuras y células epiteliales	22
1.1.3. Mecanismo osmorregulador de crustáceos: ATPasa Na ⁺ /K ⁺	25
<i>1.2. Efecto de la salinidad en la capacidad osmorreguladora de los crustáceos.....</i>	<i>28</i>
2. Antecedentes	30
2.1. <i>Biología de L. vannamei.....</i>	<i>30</i>
2.2. <i>Osmorregulación en L. vannamei</i>	<i>32</i>
2.2.1. Tolerancia a la salinidad en <i>L. vannamei</i>	32
2.2.2. NKA en <i>L. vannamei</i>	34
3. Justificación	35
4. Hipótesis	37
5. Objetivos	38
6. Materiales y Métodos generales	39
6.1 <i>Material biológico: Organismos</i>	<i>39</i>
6.2 <i>Diseño experimental.....</i>	<i>39</i>
7. Capítulo I. Eurihalinidad y patrón osmorregulador de <i>L. vannamei</i> (Boone, 1931) de larva hasta adulto.	41
7.1. <i>Introducción</i>	<i>41</i>
7.2. <i>Materiales y Métodos.....</i>	<i>41</i>
7.2.1. Tolerancia a la salinidad.....	41

7.2.2. Patrón osmorregulador y capacidad osmótica.....	43
7.3. Resultados	44
7.3.1. Tolerancia a la salinidad.....	44
7.3.2. Patrón osmorregulador y CO.....	45
7.3.3. Supervivencia a las 48h.....	47
7.4. Discusión	49
7.5. Resumen del capítulo I.....	53
8. Capítulo II. Descripción de la cámara branquial de <i>L. vannamei</i>: presencia de ionocitos y función osmorreguladora.	55
8.1. Introducción	55
8.2. Materiales y Métodos.....	56
8.2.1. Análisis morfológico de la cámara branquial y su estructura celular	57
8.2.2. Localización de la NKA en la cámara branquial mediante IFI.....	58
8.2.3. Localización de ionocitos mediante MET.....	58
8.3. Resultados	59
8.3.1. Formula branquial	59
8.3.2. Topografía celular y ultraestructura de ionocitos de la cámara branquial	62
8.3.3. Localización de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺ en la cámara branquial (IIF)	71
8.4. Discusión.....	73
8.5. Resumen del capítulo II.....	77
9. Capítulo III. Adaptaciones moleculares y celulares de <i>L. vannamei</i> a la variación en la salinidad ambiental.	79
9.1. Introducción	79
9.2. Materiales y métodos	80
9.2.1. Etapas del desarrollo estudiadas y diseño experimental	80
9.2.1.1. Obtención de muestras para el análisis de la expresión de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺	80
9.2.1.2. Obtención de muestras para el análisis de la ultraestructura celular de ionocitos.....	80
9.2.2. Procesado y análisis de muestras	81
9.2.2.1. Obtención de cDNA	81
9.2.2.2. Amplificación por PCR en tiempo real (qPCR).....	82
9.2.2.3. Procesado de muestras para determinar la ultraestructura celular	84
9.3. Resultados	85

9.3.1. Niveles de expresión de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺	85
9.3.2. Ultraestructura celular de ionocitos en diferentes salinidades	88
9.4. <i>Discusión</i>	92
9.5. <i>Resumen del capítulo III</i>	94
10. Discusión general	96
11. Conclusiones	101
12. Recomendaciones	103
13. Literatura citada	104
14. Anexo	112
14. 1. <i>Protocolos</i>	112
1. Deshidratación Alcohol – Benceno para crustáceos y desparafinación	112
2. Tinción Hematoxilina y Eosina para tejido de camarón <i>L. vannamei</i> en diferentes etapas del desarrollo (de Nauplio a Adulto).....	112
3. Preparación de laminillas Poli L lisina.....	113
4. Inmunofluorescencia Indirecta.....	114
5. Extracción de RNA	115
6. Tratamiento de DNAsas y Retrotranscripción	116
7. PCR de punto final	117
8. qPCR para la α -NKA de <i>L. vannamei</i>	117

Lista de Figuras y Tablas

Figura 1. Patrones osmorreguladores en crustáceos.	20
Figura 2. Comportamiento fisiológico hipotético de un crustáceo marino en ambientes de diferente salinidad	20
Figura 3. Esquema de la estructura de un corte transversal de camarón a nivel del cefalotórax.....	22
Figura 4. Tipos de branquias en crustáceos.	23
Figura 5. Distribución de las branquias de decápodos en la cámara branquial con base en la zona de inserción.....	23
Figura 6. Modelos hipotéticos para la regulación iónica en los ionocitos de crustáceos.	27
Figura 7. Camarón blanco <i>L. vannamei</i> . Se indica la posición taxonómica (De Grave <i>et al.</i> , 2009).....	30
Figura 8. Esquema del ciclo de vida típico de los camarones Peneidos.	32

Figura 9. Supervivencia en las etapas del desarrollo evaluadas de <i>L. vannamei</i> a las 5 hps.	45
Figura 10. Ontogenia del patrón de osmorregulación de <i>L. vannamei</i> a las 24 h en etapas seleccionadas.	46
Figura 11. Capacidad osmótica de <i>L. vannamei</i> en etapas seleccionadas a las 24 h pso.	47
Figura 12. Supervivencia de <i>L. vannamei</i> en las seis salinidades de prueba durante 48 h pso.	48
Figura 13. Anormalidades anatómicas de <i>L. vannamei</i> al final del experimento.	49
Figura 14. Vista lateral de Mysis 1 de <i>L. vannamei</i>	60
Figura 15. Vista lateral de PL1 y PL4 de <i>L. vannamei</i>	60
Figura 16. Vista lateral de la cámara branquial de <i>L. vannamei</i> a la edad de PL10.	61
Figura 17. Branquias de <i>L. vannamei</i> a la edad de PL22.	62
Figura 18. Epioditos de PL10 y adulto de <i>L. vannamei</i>	62
Figura 19. Corte transversal de la región del cefalotórax de Zoea 3 de <i>L. vannamei</i>	63
Figura 20. Topografía celular de un corte transversal en la región del cefalotórax de Mysis 1 y Mysis 2 de <i>L. vannamei</i>	64
Figura 21. Topografía celular de PL1 y PL4 de <i>L. vannamei</i>	65
Figura 22. Ultraestructura celular del branquiostegito y epipodito de PL1 de <i>L. vannamei</i>	66
Figura 23. Topografía celular comparada de los branquiostegitos de <i>L. vannamei</i>	67
Figura 24. Ultraestructura celular del branquiostegito de PL15 de <i>L. vannamei</i>	68
Figura 25. Topografía celular comparada de los epipoditos de a) PL15, b) PL39, c) Juvenil y d) Adulto de <i>L. vannamei</i>	69
Figura 26. Ultraestructura celular del epipodito del adulto de <i>L. vannamei</i>	69
Figura 27. Topografía celular comparada de las branquias de a) PL15, b) PL39, c) juvenil y d) adulto de <i>L. vannamei</i>	70
Figura 28. Ultraestructura celular de las branquias de <i>L. vannamei</i> en a) PL15, b y c) juvenil, d, adulto.	71
Figura 29. Localización celular de la α -NKA en a) PL15 y b) juvenil de <i>L. vannamei</i>	72
Figura 30. Comparación de la topografía celular y la localización de la NKA en el epipodito (a y b) y el branquiostegito (c y d) del juvenil de <i>L. vannamei</i>	73
Figura 31. Electroforesis de productos PCR del gen L8 de muestras de <i>L. vannamei</i> en gel de agarosa (1%).	82
Figura 32. Electroforesis de productos PCR del gen actina y la α -NKA de muestras de <i>L. vannamei</i> en gel de agarosa (1%).	82
Figura 33. Curva de disociación de la NKA de diferentes etapas de <i>L. vannamei</i>	86
Figura 34. Diagrama de amplificación de la curva estándar y las muestras de tejido de <i>L. vannamei</i>	87
Figura 35. Niveles de expresión de los transcritos de la α -NKA en el desarrollo de <i>L. vannamei</i> (de la etapa naupliar hasta el adulto) en diferentes salinidades.	88
Figura 36. Ultraestructura del epipodito de PL1 de <i>L. vannamei</i> en la salinidad de 20 UPS.	89
Figura 37. Ultraestructura celular del epipodito de juvenil de <i>L. vannamei</i> en 45 y 5 UPS.	90

Figura 38. Ultraestructura celular del branquiostegito de <i>L. vannamei</i> . a, PL1 en 20 UPS; b y c, PL15 en 5 UPS.....	91
Figura 39. Ultraestructura celular de las branquias de <i>L. vannamei</i> en a) PL15, b, c, d) juvenil en distintas salinidades.....	91
Tabla 1. Resumen de algunas investigaciones que evalúan la supervivencia de <i>L. vannamei</i> en diferentes salinidades.....	34
Tabla 2. Etapas del desarrollo evaluadas durante el experimento de supervivencia.....	42
Tabla 3. Resumen de la localización de la α -NKA mediante IIF en estructuras de la cámara branquial de diversas etapas del desarrollo de <i>L. vannamei</i>	72
Tabla 4. Parámetros obtenidos de la curva estándar del qPCR de la α -NKA para cada etapas del desarrollo de <i>L. vannamei</i>	85

Lista de abreviaciones

Abreviación	Significado
ABI	Termociclador Step One Plus de Applied Biosystems
ACI	Anticuerpo primario
ACII	Anticuerpo secundario
Art	Artrobranquias,
Br	Branquiostegito
C	Cutícula
Ce	Cutícula externa
Ci	Cutícula interna
CB	Cámara Branquial
CO	Capacidad Osmótica
E	Epipodito
Ep	Epitelio
FITC	5'- isotiocionato de fluoresceína
G	Branquias
GA	Glándula antenal
H	Hemolinfa
H - E	Tinción Hematoxilina-Eosina
Hem	Hemocito en circulación

Hp	Hepatopáncreas
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
Inva	Invaginación apical
Invb	Invaginación basal
IPICYT	Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
J	Juvenil
LH	lacunas hemolinfáticas
M	Mitocondria
M1	Mysis 1
M2	Mysis 2
M3	Mysis 3
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
Mi	Microvellosidad
mOsm/Kg	miliOsmoles/Kilogramo;
N	Núcleo
N2	Nauplio 2
N6	Nauplio 6
NaCl	Cloruro de Sodio
P1	Pereiópodo 1
P2	Pereiópodo 2
P3	Pereiópodo 3
P4	Pereiópodo 4
P5	Pereiópodo 5
PI	Punto isosmótico
P1	Pleura
PL1	Poslarva 1
PL12	Poslarva 12
PL15	Poslarva 15
PL19	Poslarva 19
PL2	Poslarva 2

PL22	Poslarva 22
PL27	Poslarva 27
PL3	Poslarva 3
PL4	Poslarva 4
PL5	Poslarva 5
PL7	Poslarva 7
Ple	Pleurobranquias
Pod	Podobranquias
qPCR	PCR en tiempo real
S	Supervivencia
SO ₄ ⁻²	Sulfato
Sp	Séptum primario
Ss	Séptum secundario
Tc	Tejido conjuntivo
Td	Tubo digestivo
Tf	Temperatura de fusión
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
Vh	Vaso hemolinfático
Z3	Zoea 3
α-NKA	Subunidad α de la ATPasa Na ⁺ /K ⁺

1. Introducción

La osmorregulación es necesaria para mantener en niveles apropiados el volumen de agua y la concentración de iones y de osmolitos en los fluidos internos de los animales (Randall, 1998). Las variaciones en la salinidad del agua se ven reflejadas en la supervivencia y en la osmolalidad de la hemolinfa (o la sangre) de los animales marinos, pero además en la ultraestructura celular y en los mecanismos moleculares para contrarrestar tales variaciones (Péqueux, 1995). La osmorregulación es particularmente importante en los crustáceos acuáticos que viven en la zona costera o que son parte de actividades acuícolas, en donde la salinidad del medio ambiente varía ampliamente. Tal es el caso del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

L. vannamei es un crustáceo (decápodo) marino con diversas etapas larvarias y un ciclo de vida complejo que incluye diferentes hábitats (océano vs estuarios). Es una especie de camarón importante en la industria comercial nacional (CONAPESCA, 2009; Giffard-Mena *et al.*, 2014) y a nivel mundial es ampliamente cultivada en diferentes condiciones de salinidad y temperatura (Davis, 2004; Zhang *et al.*, 2009). Si bien la especie ha sido ampliamente investigada para evaluar su supervivencia y la respuesta osmótica de la hemolinfa ante variaciones en la salinidad ambiental, la caracterización de sus capacidades osmorreguladoras básicas aún están incompletas.

El grupo de los crustáceos presenta diversos patrones osmorreguladores; su capacidad osmótica difiere según la especie y la etapa del desarrollo (Charmantier y Wolcott, 2001). En estos animales se ha demostrado que existen estructuras especializadas en la osmorregulación caracterizadas por epitelios con ionocitos (células transportadoras de iones) y enzimas para el transporte iónico (*e.g.* ATPasa Na⁺/K⁺) (Péqueux *et al.*, 2006).

El desarrollo progresivo de las capacidades osmorreguladoras es crucial en los crustáceos y se ha descrito en el cangrejo *Carcinus maenas* (Cieluch *et al.*, 2004) la langosta *Homarus gammarus* (Lignot y Charmantier, 2001), el langostino *Macrobrachium amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013) y en los camarones *Penaeus japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994), *Crangon Crangon* (Cieluch *et al.*, 2005) y

Litopenaeus stylirostris (Pham *et al.*, 2012a). En ellos se ha establecido que la capacidad para osmorregular se adquiere con el desarrollo gradual de epitelios específicos a partir de las etapas larvales. Sin embargo, en el camarón *L. vannamei* se desconoce cómo se lleva a cabo este proceso y en qué etapas de su desarrollo alcanzan la eurihalinidad, así como el efecto de las variaciones en la salinidad del ambiente a nivel celular y molecular durante su ontogenia.

El objetivo de la presente investigación es evaluar la capacidad osmorreguladora desde larvas hasta adultos de *L. vannamei* con base en: 1) La tolerancia a la salinidad; 2) El establecimiento de la función osmorreguladora en la cámara branquial (ionocitos y ATPasa Na^+/K^+); y 3) El efecto de la salinidad en los niveles de transcritos de la ATPasa Na^+/K^+ y en la ultraestructura celular de los ionocitos.

1.1. Osmorregulación en crustáceos: generalidades

La salinidad se refiere al contenido de sales disueltas en el agua de mar y está constituida principalmente de iones inorgánicos ($\text{Cl}^- > \text{Na}^+ > \text{SO}_4^{-2} > \text{Mg}^{+2} > \text{Ca}^{+2} > \text{K}^+$) (Bhatt, 1978). Se expresa en forma de Unidades Prácticas de Salinidad (UPS) o en términos de osmoconcentración (osmolalidad en miliOsmoles/L; mOsm/L). La salinidad del agua de mar equivale aproximadamente a 34 UPS ó 1000 mOsm/L (Bradley, 2009) y es una variable ambiental importante en los crustáceos dado que impacta procesos biológicos a los diferentes niveles de organización; poblacional, fisiológico y molecular (Péqueux, 1995). Este impacto depende de la especie y su etapa del desarrollo (Charmantier, 1998).

Con base en la tolerancia a los niveles de salinidad se reconocen tres tipos de crustáceos. Por ejemplo, aquellas especies que viven en hábitats de salinidad estable son estenohalinas. Las especies que toleran amplias variaciones de salinidad pero no son capaces de sobrevivir por periodos de tiempo prolongado en dichas condiciones se nombran eurihalinas fisiológicas (o de laboratorio), mientras que aquellas que toleran un amplio intervalo de salinidades en su hábitat natural se conocen como eurihalinas ecológicas (Péqueux *et al.*, 2006).

Para asegurar su supervivencia en el hábitat acuático, los animales deben

garantizar la estabilización de sus fluidos internos, tanto en volumen de agua como en concentración iónica. De tal manera que cuando existen variaciones en el ambiente externo, las diferencias sean compensadas de alguna forma (Vernberg y Vernberg, 1975). Dichas estrategias varían ampliamente. Está demostrado que los crustáceos tienen capacidades osmorreguladoras para hacer frente a los cambios salinos y que todas las especies (incluyendo las estenohalinas) deben poseer mecanismos para osmorregular. La estabilización debe efectuarse en dos niveles: a nivel celular y en los fluidos extracelulares (hemolinfa) (Péqueux *et al.*, 2006).

A nivel celular, según Léon Fredericq (1901) la osmolalidad de los fluidos intracelulares siempre es igual a la del medio extracelular (regulación isosmótica). No obstante, los efectores osmóticos difieren entre ambos fluidos. Las proteínas intracelulares contribuyen al efecto Donnan; el desbalance que generan permite la entrada de fluido extracelular a la célula y un incremento en la concentración de Na^+ , catión más abundante del fluido extracelular. Como resultado hay una entrada de agua e incremento en el volumen celular. El restablecimiento del volumen se controla mediante mecanismos de transporte iónico activo. La proteína ATPasa Na^+/K^+ es clave y parte fundamental en la historia del mecanismo regulador osmótico que ha experimentado la célula desde su origen (Revisado en Péqueux *et al.*, 2006).

La hemolinfa también contiene proteínas que generan el efecto Donnan con respecto al ambiente externo. Sin embargo, las proporciones iónicas reportadas en la hemolinfa respecto al agua de mar ($\text{K}^+ > \text{Ca}^{+2} > \text{Na}^+ > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{-2} > \text{Mg}^{+2}$) difieren a las esperadas bajo el equilibrio de Donnan explicado anteriormente para la regulación intracelular. Estas diferencias iónicas de la hemolinfa con respecto al agua de mar (regulación anisosmótica) sólo se explican por la intervención de procesos activos de absorción (Na^+ , K^+ , Ca^{+2}) o excreción (Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2}) efectuados en órganos específicos (Revisado en Péqueux *et al.*, 2006).

Los límites de tolerancia de un crustáceo y el mantenimiento de la osmolalidad de su hemolinfa están basados en mecanismos limitantes y compensatorios. Los primeros están relacionados con la reducción de los gradientes de concentración (modificando los principales efectores osmóticos intracelulares; los aminoácidos) y con

la modificación del área o permeabilidad de las superficies de contacto. En los procesos compensatorios se incluyen los movimientos de transporte activo de iones para compensar las pérdidas o ganancias en los órganos específicos, incluyendo la producción de orina concentrada o diluida por la glándula antenal (Mantel y Farmer, 1983). Paralelo a esto, en algunas especies se ha demostrado la participación simultánea de un control neuroendócrino para el mantenimiento de la osmolalidad (Spanings-Pierrot, 2006).

1.1.1. Patrones y capacidades osmorreguladoras en crustáceos

La correlación que existe entre la osmolalidad de la hemolinfa y la del ambiente describe el patrón osmorregulador de los animales, mientras que la diferencia entre ambas osmolalidades a determinada salinidad indica la capacidad osmótica (CO) (Lignot *et al.*, 2000). En el camarón azul *L. stylirostris* se ha demostrado que la CO varía con el tamaño y la edad cronológica de los organismos, su estado nutricional, de desarrollo y la etapa de muda (Lignot *et al.*, 1999b). La CO es un indicador fisiológico de cómo osmorregula un organismo y es útil para describir cómo sucede la osmorregulación a través de la ontogenia.

La mayoría de los crustáceos marinos son osmoconformes, es decir, la osmolalidad de la hemolinfa es igual a la osmolalidad del ambiente externo (tendencia isosmótica) (Fig. 1). En contraste, en la tendencia osmorreguladora la osmolalidad de la hemolinfa se mantiene constante en un amplio intervalo de salinidades. Un caso especial de osmorregulación se encuentra en las especies que viven en regiones de salinidad fluctuante (*e.g.* crustáceos estuarinos), estos animales son hipo-hiper osmorreguladores; se mantienen isosmóticos en las salinidades intermedias (*e.g.* 15-30 UPS), pero hiperregulan a bajas salinidades (osmolalidad hemolinfa > ambiente externo) e hiporregulan en altas salinidades (osmolalidad hemolinfa < ambiente externo) (Fig. 1) (Gilles y Pequeux, 1983).

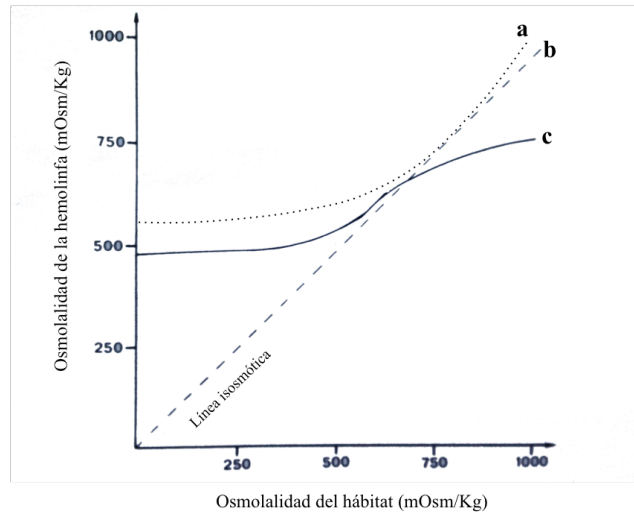


Figura 1. Patrones osmorreguladores en crustáceos. Correlación entre la osmolalidad de la hemolinfa y la del hábitat. a, hiperosmorregulación, b, osmoconformación y c, hiper-hipo osmorregulación (Modificado de Gilles y Pequeux, 1983).

En un esquema típico de hiperosmorregulación, un crustáceo marino en un ambiente hipoosmótico de baja salinidad experimentará una absorción de agua y una pérdida de sales por difusión. Estos movimientos pasivos son compensados por la producción de abundante orina diluida y una toma activa de sales (iono-regulación). Lo contrario sucede en un ambiente hiperosmótico (*e.g.* agua de mar), donde por difusión pasiva se pierde agua y ganan iones. La orina, en este caso, es limitada e isosmótica a la hemolinfa (Fig. 2) (Mantel y Farmer, 1983).

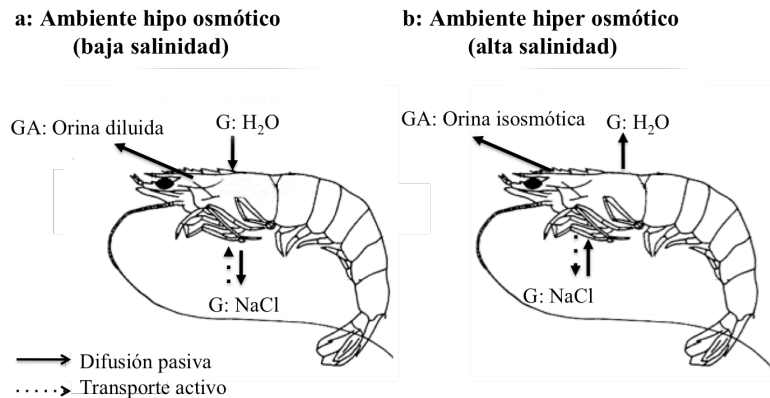


Figura 2. Comportamiento fisiológico hipotético de un crustáceo marino en ambientes de diferente salinidad. a, ambiente dulceacuícola o de baja salinidad y b, ambiente marino o de alta salinidad. Se indican los flujos de absorción y excreción de agua e iones en branquias (G) y la glándula antenal (GA) (Modificado de Mantel y Farmer, 1983).

Los patrones osmorreguladores explicados anteriormente corresponden al comportamiento de juveniles y adultos. No obstante, los crustáceos acuáticos pasan a través de un complejo ciclo de vida que comprende una fase juvenil-adulto bentónica y una fase larval pelágica. Como consecuencia de esta transición en el estilo de vida, las larvas difieren de sus conespecíficos adultos (Pittman y McAlpine, 2001). Las larvas se definen como el estado del desarrollo inicial de vida libre, con diferentes caracteres respecto a los adultos. Estos caracteres son principalmente de índole morfológico, de comportamiento y relacionados con la alimentación y locomoción, así como diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos. Los cambios ontogenéticos en la morfología y fisiología permiten a las diferentes etapas del desarrollo responder individualmente a las diferentes presiones de selección que experimentarán en su ambiente (Anger, 2006). Como resultado, los crustáceos presentan distintos patrones de osmorregulación durante su ontogenia (Charmantier, 1998).

En un primer patrón (I) se han clasificado a las especies con poca variación de sus capacidades desde que nacen; los adultos de este grupo regulan débilmente y son principalmente estenohalinos. En el segundo patrón (II), el tipo adulto de osmorregulación se establece tan pronto se alcanza el primer estado postembriónico, los adultos son eurihalinos y generalmente viven en ambientes donde la salinidad es alta, baja o variable. En el último grupo (III), las larvas son osmoconformistas o ligeramente capaces de osmorregular; en este grupo, la metamorfosis marca el inicio del tipo adulto de osmorregulación, los adultos son mesohalinos o eurihalinos y viven en ambientes de salinidad variable (Charmantier, 1998).

Independientemente de la edad de los animales, el estrés osmótico se manifiesta inicialmente a nivel de las células epiteliales que están en contacto con el ambiente externo, posteriormente en la hemolinfa y finalmente en las células de los órganos internos y sus mecanismos moleculares. Los órganos efectores involucrados en este proceso en crustáceos son las branquias, epipoditos, pleura, branquiostegitos, glándula antenal, sistema digestivo e incluso la cutícula (Péqueux *et al.*, 2006). A través de los epitelios de estas estructuras se realiza parte fundamental del balance osmótico después de cualquier desajuste (shock salino).

1.1.2. Cámara branquial de crustáceos: estructuras y células epiteliales

Los decapados constituyen el grupo más grande y diverso de crustáceos, en el que se incluye a los camarones, langostas, langostinos y cangrejos. Todos tienen sus branquias protegidas por la cámara branquial (Bauer, 1999), la cual está formada por el branquiostegito (Br) y la pleura (Pl). Los cangrejos tienen dos conjuntos de branquias (G) encerradas por una cámara branquial, mientras que en el resto, los dos conjuntos de branquias están separados en dos cámaras branquiales; una a cada lado del animal (Fig. 3).

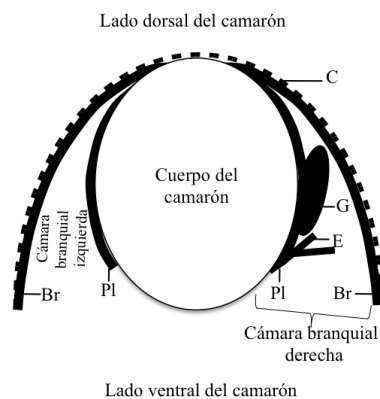


Figura 3. Esquema de la estructura de un corte transversal de camarón a nivel del cefalotórax. Se indican las dos cámaras branquiales formadas por el branquiostegito y la pleura. En la cámara branquial derecha se indican las branquias y los epipoditos. Br, branquiostegito; C, cutícula; E, epipoditos; G, branquias; Pl, pleura.

Los decápodos también pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de ramificación de sus branquias; filobranquia, tricobranquia, o dendobranquia (Fig. 4a, b, c) (Taylor y Taylor, 1992). De entre los camarones que poseen la dendobranquia, sólo los camarones Peneidos poseen la forma típica (Martin *et al.*, 2007), que es el tipo de branquia más ramificada y se caracteriza por presentar un eje central con ejes secundarios y muchas lamelas o ramificaciones terciarias. En función de la zona donde se insertan las branquias, estas se denominan artrobranquias (Art), pleurobranquias (Ple) o podobranquias (Pod). En nivel de estas últimas se ubican los epipoditos (E) (Fig. 5) (Taylor y Taylor, 1992). Los epipoditos son importantes para la osmorregulación, sin embargo han sido poco estudiados (Bouaricha *et al.*, 1994; Haond *et al.*, 1998; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013).

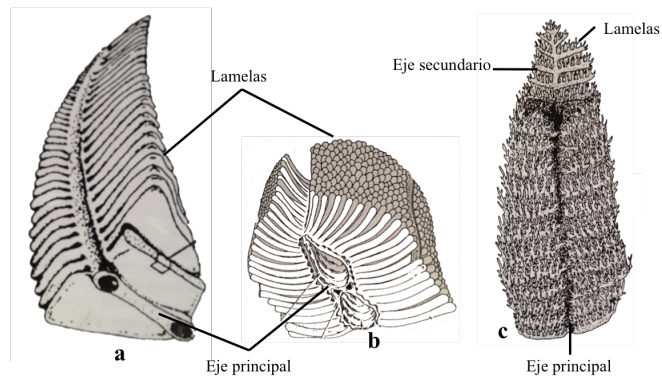


Figura 4. Tipos de branquias en crustáceos. a, Filobranquia; b, Tricobranquia y c, Dendobranquia (Modificado de Taylor y Taylor, 1992; Martin *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2008).

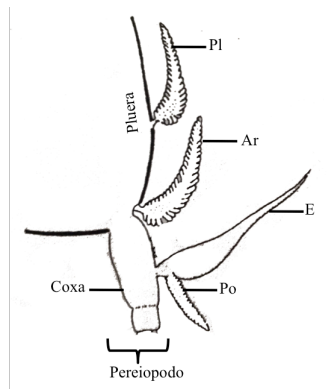


Figura 5. Distribución de las branquias de decápodos en la cámara branquial con base en la zona de inserción. Ar, artrobranquias; E, epipodito; Pl, pleurobranquias; Po, podobranquias (modificado de Taylor y Taylor, 1992).

Las estructuras de la cámara branquial se han descrito con epitelios formados por células de tipo *delgadas* (Thin), *prismática* (thick), *pestaña* (Flange), *plana* (attenuated) y *pilar* (pillar); aunque puede encontrarse un sólo tipo celular en una estructura, también es posible una combinación de tipos celulares (Taylor y Taylor, 1992). La forma de la célula y sus características ultraestructurales ayudan a interpretar su función celular. Por ejemplo, en las branquias de los langostinos del género *Macrobrachium*, una célula pilar y una prismática (o también llamada “del séptum”) forman un complejo celular para regular el balance iónico (Mendonça *et al.*, 2007; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2014). Las células prismáticas (también llamadas ionocitos) mencionadas por Taylor y Taylor (1992) son células especializadas del epitelio para regular el balance iónico. Otros tipos

celulares como las células planas o delgadas forman parte de los epitelios especializados en el transporte gaseoso (Taylor y Taylor, 1992).

Los ionocitos se caracterizan en su ultraestructura por poseer microvellosidades dispuestas hacia la parte apical o invaginaciones apicales (Bouaricha *et al.*, 1991) y una membrana basal y basolateral muy plegada, además de un gran número de mitocondrias y un mecanismo molecular específico, principalmente impulsado por la presencia de la ATPasa Na^+/K^+ (Péqueux, 1995). En los ionocitos también se han reportado transportadores como los canales de K^+ , Na^+ , Cl^- , el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, los antipuestos Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, la ATPasa de H^+ -tipo V y la Anhidrasa Carbónica (Mantel y Farmer, 1983; Freire *et al.*, 2008; McNamara y Faria, 2012).

El estudio de los ionocitos con base en técnicas como la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para localizar la ATPasa Na^+/K^+ han permitido reconocer a los principales órganos efectores de la osmorregulación en los crustáceos. La ATPasa Na^+/K^+ se localiza en la región basal y lateral de la célula de los epitelios de las G, Br, E, Pl y la GA. Las investigaciones realizadas en las etapas juvenil y adulto coinciden en que las branquias posteriores son el sitio más importante para la osmorregulación en los cangrejos (*e.g. C. maenas, C. sapidus, Uca pugnax, Chasmagnathus granulatus*), pero no así en los otros decápodos. Tanto en la langosta *H. gammarus* como en los camarones *Rimicaris exoculata, Palaemon adspersus, P. japonicus* y *L. stylirostris* se ha demostrado que las branquias tienen un epitelio delgado (propio para la respiración) y se ha sugerido que otras estructuras como el Br y los E son más importantes. Algo similar ocurre con el langostino *M. amazonicum* y el camarón *C. crangon*, pero en estas especies las branquias también contribuyen al balance iónico. No hay estudios al respecto en *L. vannamei*.

Los epitelios de las estructuras (G, Br, Pl, E, GA) se especializan durante la ontogenia para incrementar las capacidades osmorreguladoras de los crustáceos. La especialización ocurre tanto a nivel celular (por la presencia de ionocitos) como a nivel molecular (por la presencia de la ATPasa Na^+/K^+). Este desarrollo de las capacidades osmorreguladoras es crucial para los crustáceos, pero ha sido descrito tan solo en

algunas especies como el cangrejo *C. maenas* (Cieluch *et al.*, 2004), la langosta *H. gammarus* (Lignot y Charmantier, 2001), el langostino *M. amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013), y en los camarones *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994), *C. Crangon* (Cieluch *et al.*, 2005) y *L. stylirostris* (Pham *et al.*, 2012a).

Se ha demostrado que en algunas especies de crustáceos los epitelios específicos para osmorregular se van desarrollando gradualmente y existe una transferencia de la función osmorreguladora según el crecimiento de los organismos. En general, al inicio del desarrollo en los crustáceos (larvas) las G y E aún no están desarrollados y la PI, el Br y la GA son los responsables de la osmorregulación. Posteriormente, la PI deja de funcionar y en algunas especies las G, E, Br y GA son las responsables de la osmorregulación en la etapa juvenil y adulta; no obstante, la contribución de cada estructura en el balance iónico depende de la especie (revisado en: Bouaricha *et al.*, 1994; Lignot y Charmantier, 2001; Cieluch *et al.*, 2004; Cieluch *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2012a; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013).

1.1.3. Mecanismo osmorregulador de crustáceos: ATPasa Na⁺/K⁺

El mecanismo molecular para el transporte iónico en crustáceos ha sido estudiado principalmente en aquellos organismos que presentan un comportamiento de hiperosmorregulación en baja salinidad. El mecanismo molecular en los crustáceos que también hiporregulan en condiciones de alta salinidad se desconoce, pero se ha propuesto que es similar a lo que sucede en los peces, en donde la entrada pasiva de NaCl a los compartimientos celulares es compensada por la secreción activa de NaCl por los ionocitos y lo contrario sucede en la hiperosmorregulación. Un resumen de los mecanismos moleculares para el transporte iónico en crustáceos se encuentra en (Mantel y Farmer, 1983; Freire *et al.*, 2008; McNamara y Faria, 2012).

La presencia y actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ (NKA) se ha reportado en la hipo e hiperosmorregulación (Freire *et al.*, 2008), y aunque no es la única proteína relacionada con la osmorregulación, es la que genera la energía necesaria para que se efectúe el transporte de otros iones, de nutrientes y aminoácidos a la célula, así como en la regulación del potencial eléctrico en las fibras nerviosas (Sáez *et al.*, 2009). El funcionamiento hipotético del mecanismo osmorregulador propuesto en los crustáceos

ha sido sintetizado por McNamara y Faria (2012) y se describe brevemente a continuación:

En la hiperosmorregulación existe una absorción activa de NaCl que compensa la pérdida pasiva al medio ambiente diluido. Este comportamiento osmorregulador es distinto según el grado de hiperosmorregulación que presente la especie; fuerte o débil (Freire *et al.*, 2008), sin embargo esta terminología es arbitraria y requiere revisión (McNamara y Faria, 2012).

En la hipoosmorregulación fuerte, la absorción activa de NaCl por la célula es sostenida por la NKA en el lado basolateral y la ATPasa de H⁺-tipo V en el lado apical. La absorción de Na⁺ se realiza a través de canales de Na⁺ en la membrana apical, mientras que el Cl⁻ se absorbe vía el antipuerto apical Cl⁻/HCO₃⁻. La entrada de Na⁺ se lleva a cabo por el cambio de polarización que genera la ATPasa de H⁺-tipo V, la cual bombea activamente H⁺ al espacio subcuticular, hiperpolarizando la membrana apical y permitiendo el movimiento del Na⁺ por debajo de su gradiente electroquímico hacia el citoplasma de la célula. Los H⁺ necesarios son generados por la Anhidrasa Carbónica citosólica, la cual hidrata el CO₂ metabólico a H⁺ y HCO₃⁻. El incremento del HCO₃⁻ en la región apical del citoplasma dirige la entrada de Cl⁻ a través del antipuerto apical Cl⁻/HCO₃⁻. La salida del Na⁺ hacia la hemolinfa se realiza a través de la NKA quien a cambio bombea K⁺ al interior. Esta enzima junto a los canales basales de K⁺, que reciclan este catión y generan el potencial eléctrico negativo en la célula, permiten la salida del Cl⁻ hacia la hemolinfa a través de los canales basales de Cl⁻ (Fig. 6a).

En la hiperosmorregulación débil, la función de la NKA permanece sin cambio y aparentemente la ATPasa de H⁺-tipo V no está presente. En este modelo, los canales apicales de K⁺, los cuales reciclan este catión al espacio subcuticular, hiperpolarizan la membrana apical permitiendo la entrada del Na⁺ por el cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻. La absorción del Na⁺ es aumentada por el antipuerto Na⁺/H⁺. En este modelo la Anhidrasa Carbónica proporciona el H⁺ y el HCO₃⁻ para el antipuerto apical Na⁺/H⁺ y el antipuerto Cl⁻/HCO₃⁻, quien dirige la entrada de Cl⁻ hacia el citosol. El Na⁺ es bombeado fuera de la membrana basolateral de la célula a través de la NKA, mientras que los canales de K⁺ basolaterales garantizan nuevamente el potencial negativo para que el Cl⁻ pueda salir a

través de canales de Cl^- . En este comportamiento hiperosmorregulador se sugiere que hay un transporte de Na^+ paracelular (Fig. 6b).

En la hipoosmorregulación se lleva a cabo una excreción activa de NaCl . Los transportadores proteicos que se han descrito son la NKA, los canales de K^+ , Na^+ , Cl^- y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ que ahora se localiza en la región basolateral de la célula. El Na^+ y el Cl^- entran a la célula a través del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ dirigidos por el gradiente de concentración que genera la NKA y la entrada pasiva de Na^+ del medio externo. El Na^+ regresa a la hemolinfa a través de la NKA, mientras que el K^+ es reciclado por el canal de K^+ en la región basal de la célula. Esto genera el potencial celular negativo que dirige la salida del Cl^- a través de los canales apicales de Cl^- . La salida del Cl^- y el incremento de este ion en el espacio subcuticular genera un voltaje transepitelial negativo que dirige la secreción paracelular del Na^+ (Fig. 6c).

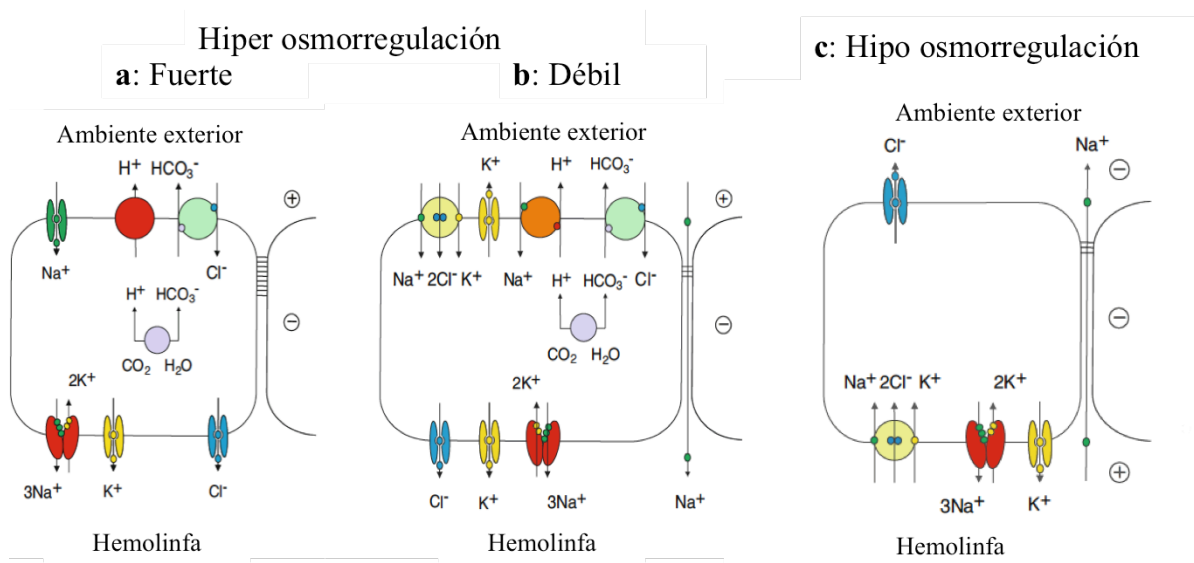


Figura 6. Modelos hipotéticos para la regulación iónica en los ionocitos de crustáceos. Se indican los transportes en el comportamiento hiper osmorregulador fuerte (a) y débil (b), así como en la hipo osmorregulación (c) (Modificado de McNamara y Faria, 2012).

La NKA es una proteína altamente conservada durante la evolución de los seres vivos. Se encarga de mantener el balance de iones intracelulares intercambiando tres iones Na^+ por dos iones K^+ utilizando la hidrólisis del ATP. Este balance se genera en contra de la concentración de los cationes pero garantiza el mantenimiento de un gradiente electroquímico. En vertebrados, la NKA es una proteína transmembranal

formada por tres subunidades. La subunidad a es la encargada del transporte del Na^+ y K^+ , se activa mediante una transición conformacional acoplada a la hidrólisis de ATP. Se ha sugerido que la subunidad b es necesaria para la función catalítica y el posicionamiento de la subunidad a en la membrana, así como una subunidad pequeña g que regula la actividad. En vertebrados las tres existen en diversas isoformas dependiendo del organismo y tejido (Sáez *et al.*, 2009).

En crustáceos, la NKA se ha descrito con las mismas funciones que tiene en las células de vertebrados. Además de investigaciones que reportan que esta enzima puede estimularse y transportar NH_4^+ en sustitución de K^+ para realizar el intercambio del Na^+ hacia la hemolinfa (Towle *et al.*, 2001). En contraste con los vertebrados, las isoformas de la subunidad α de la NKA (α -NKA) han sido poco descritas. La secuencia del cDNA de esta enzima se ha deducido para *A. franciscana* en la que se han reportado dos isoformas; $\alpha 1$ en la glándula de la sal, intestino medio y glándula antenal y $\alpha 2$ sólo en la glándula de la sal (Baxter-Lowe *et al.*, 1989). Sin embargo, no hay evidencias de isoformas con base en el análisis de las secuencias de cDNA de branquias del cangrejo *C. sapidus* (Towle *et al.*, 2001) ni en las branquias y hepatopáncreas del camarón *E. carinicauda* (Li *et al.*, 2015) ni en diferentes órganos (branquias, glándula antenal, estómago) del cangrejo *Scylla paramamosain* (Chung y Lin, 2006). Paralelo a esto, con base en análisis Western blot, Furriel *et al.* (2000) reportan que la α -NKA en las branquias de la langosta *Macrobrachium olfersii* sólo se presenta una isoforma (Furriel *et al.*, 2000).

1.2. Efecto de la salinidad en la capacidad osmorreguladora de los crustáceos

El éxito de los crustáceos para tolerar natural o artificialmente las variaciones en la salinidad ambiental (eurihalinos ecológicos o fisiológicos) depende de su capacidad osmorreguladora. La cual en este trabajo incluye el estudio del desarrollo de las estructuras de la cámara branquial en conjunto con los ionocitos y la presencia / localización de la NKA.

Se ha demostrado que en juveniles o adultos la salinidad tiene un efecto significativo en la ultraestructura de los ionocitos. El epitelio de las branquias del cangrejo *C. granulatus* se vuelve más alto (grueso) cuando se expone a baja y alta salinidad (Genovese *et al.*, 2000). En los ionocitos de la langosta *H. gammarus* (Haond *et al.*, 1998) y del cangrejo *C. granulatus* (Genovese *et al.*, 2004) expuestos a baja salinidad, tanto la región basolateral como las microvellosidades apicales están más desarrolladas; mientras que en el langostino *M. amazonicum* la superficie apical de las células pilar se incrementa considerablemente (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2014). El efecto de la alta salinidad en la ultraestructura celular ha sido menos investigada. En el cangrejo *C. granulatus*, las microvellosidades de la superficie apical de la célula se vuelven irregulares y se generan grandes espacios entre ellas (Genovese *et al.*, 2004). No obstante, se desconoce el efecto de los cambios de salinidad a nivel celular (ultraestructura) durante las etapas tempranas de la ontogenia de los crustáceos.

El efecto de la salinidad sobre el mecanismo molecular (NKA) se ha descrito principalmente en adultos y juveniles, aunque para el camarón *L. vannamei* hay reportes en adultos, juveniles y en algunas poslarvas. Las investigaciones se han enfocado a cuantificar la actividad enzimática, la expresión de la proteína y en mucha menor proporción a nivel de transcritos (mRNA) en las branquias.

A nivel de la actividad enzimática, la NKA incrementa a baja salinidad en *C. sapidus* (Towle *et al.*, 2001; Lovett *et al.*, 2006), *S. paramamosain* (Chung y Lin, 2006), *C. granulatus* (Genovese *et al.*, 2004), *C. maenas* (Lucu y Flik, 1999) y *U. pugnax* (Holliday, 1985), así como en las PL18-20 (Palacios *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2007), juveniles (Hurtado *et al.*, 2007) y adultos de *L. vannamei* (Huong *et al.*, 2010). La actividad enzimática disminuye cuando los langostinos *M. olfersii* se transfieren a alta salinidad (Mendonça *et al.*, 2007), aunque en algunos cangrejos como *U. pugnax* (Holliday, 1985), *S. paramamosain* (Chung y Lin, 2006), *C. granulatus* (Luquet *et al.*, 2005) así como en los juveniles de *L. vannamei* (Hurtado *et al.*, 2007) la actividad enzimática no se modifica en alta salinidad.

En cuanto al análisis de la expresión proteica, mediante Western blot, sólo se ha reportado con un incremento a baja salinidad en adultos de *L. vannamei* (Pan *et al.*,

2014); mientras que en *M. olfersii* (Mendonça *et al.*, 2007), *C. sapidus* (Towle *et al.*, 2001) y *C. maenas* (Lucu y Flik, 1999) no hay cambios en la expresión de esta proteína; lo mismo ocurre para *S. paramamosain* tanto en alta como en baja salinidad (Chung y Lin, 2006).

El nivel de transcritos de la NKA incrementa tanto en baja como en alta salinidad en *S. paramamosain* (Chung y Lin, 2006), *C. granulatus* (Luquet *et al.*, 2005) y en *E. carinicauda* (Li *et al.*, 2015). El incremento en bajas salinidades también se ha reportado en juveniles y adultos de *P. vannamei* (Sun *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2014) y en adultos de *P. monodon* (Shekhar *et al.*, 2014). No obstante, también se ha reportado que la expresión de transcritos en *C. sapidus* no varía con la salinidad (Towle *et al.*, 2001).

El incremento o disminución en la actividad junto a un incremento en la expresión proteica y de transcritos no es clara (no todas las investigaciones cuantifican todos los niveles), pero aparentemente la respuesta está en función de la especie y es dependiente del tiempo de exposición y del nivel de la salinidad.

2. Antecedentes

Especie de estudio: *L. vannamei* (Boone 1931).



Phylum: Artropoda
Subfilum: Crustacea
Clase: Malacostraca
Subclase: Eumalacostraca
Superorden: Eucarida
Orden: Decapoda
Suborden: Dendobranquiata
Superfamilia: Penaoidea
Familia: Penaeidae
Genero: *Litopenaeus* (Pérez Farfante, 1969)
Especie: *vannamei* (Boone, 1931)

Figura 7. Camarón blanco *L. vannamei*. Se indica la posición taxonómica (De Grave *et al.*, 2009).

2.1. Biología de *L. vannamei*

L. vannamei (Boone 1931) es un camarón marino comúnmente conocido como camarón blanco; su posición taxonómica se indica en la figura 7 (De Grave *et al.*, 2009).

Este camarón se desarrolla gradualmente en seis etapas de Nauplio (N1-6), tres de Zoea (Z1-3), tres de Mysis (M1-3) y varias poslarvas (PL) antes de convertirse en juvenil (Kitani, 1986). Las etapas poslarvales se nombran con base en los días después de la metamorfosis (PL1 a PL30-45) hasta que alcanzan la talla de juvenil (>1 gr) (E. Wong, 2011; comunicación personal), preadulto y adulto (maduro sexualmente).

Las etapas naupliares de los Peneidos no necesitan alimento para completar su desarrollo a la primera etapa de Zoea. La metamorfosis a Zoea trae consigo el desarrollo del sistema digestivo y la capacidad para alimentarse. En Zoea 3 el sistema digestivo tiene capacidad para digerir microalgas y otras partículas de tamaño y flexibilidad similar. Después de la transformación a la etapa Mysis se establece la capacidad de alimentación carnívora y la posibilidad de alimentarse de microorganismos del bentos, comportamiento que continua en etapas posteriores y hasta adulto (Abrunhosa y Melo, 2008).

El crecimiento de los camarones, igual que en otros crustáceos, incluye el reemplazo del exoesqueleto a través de un proceso conocido como ecdisis (muda). Durante este ciclo suceden diversos cambios de comportamiento, así como modificaciones fisiológicas y tegumentarias. Este proceso incluye las fases; postmuda (A y B), intermuda (C), premuda (D0-D4) y finalmente la ecdisis (E). La etapa C se considera de estabilidad celular y es la evaluada en los estudios de osmorregulación. El ciclo completo de muda reportado para *L. vannamei* (10-20 g) en cautiverio dura 13 días, con 1.3 días en la fase C (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2006).

L. vannamei tiene un ciclo de vida complejo que comprende una fase larval pelágica y una fase juvenil-adulto bentónica (FAO, 2004). La eclosión y el desarrollo larvario ocurren en el océano, mientras que las etapas poslarvales colonizan las lagunas costeras o estuarios para crecer hasta juveniles y preadultos, regresando posteriormente al océano para reproducirse (Fig. 8). El uso de hábitat de *L. vannamei* en su zona de distribución se conoce parcialmente. Por ejemplo, el reclutamiento de esta especie en la Bahía Salinas del Marqués, Oaxaca ocurre en individuos de entre 4.8 a 6.1 mm de longitud total (LT) (Rámos-Crúz y Rámos-Santiago, 2006). Mientras que la emigración de la Laguna Mar Muerto en Oaxaca se tiene registrada a tallas de entre 60 y 80 mm de

LT, después de 72 a 121 días del reclutamiento (Medina-Reyna, 2001).

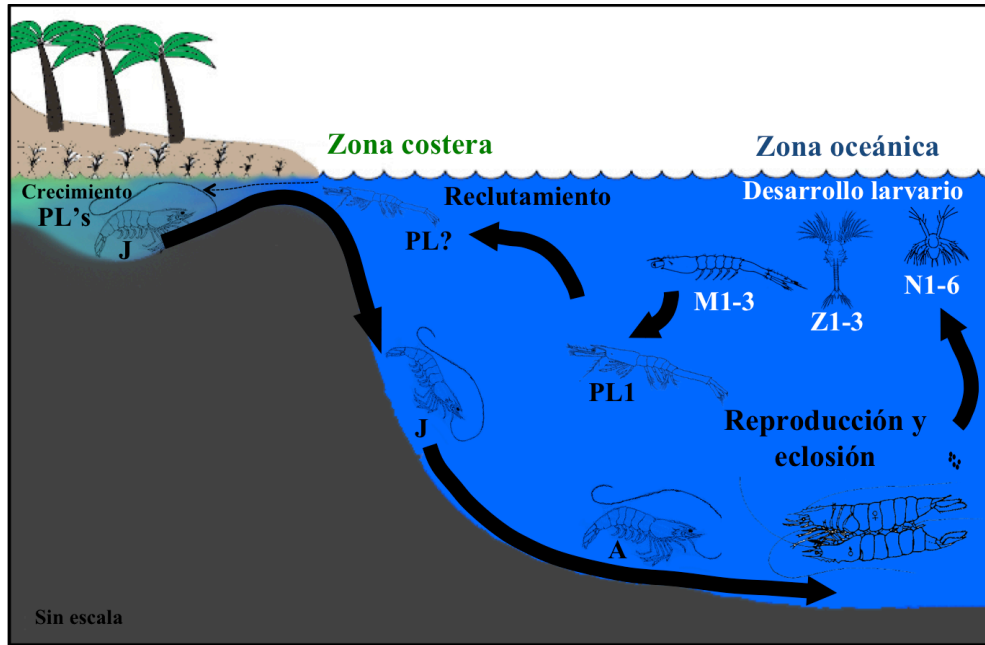


Figura 8. Esquema del ciclo de vida típico de los camarones Peneidos. Se indican las etapas larvales (N: Nauplio, Z: Zoea y M: Mysis), poslarvales (PL), juvenil (J) y adulto (A). Modificado de FAO (2004).

2.2. Osmorregulación en *L. vannamei*

Las investigaciones relacionadas con la osmorregulación en *L. vannamei* se han enfocado a determinar el grado de eurihalinidad y comprender cómo afecta la salinidad la osmolalidad de su hemolinfa en adultos y juveniles; así como la supervivencia y el crecimiento tanto de adultos como de juveniles, y en algunos casos en las poslarvas (PL2-PL20), principalmente en condiciones de baja salinidad. Se desconoce el efecto de la salinidad a nivel celular, mientras que a nivel molecular la mayoría de las investigaciones evalúan la actividad enzimática de la NKA, y en menor proporción su expresión proteica o transcripción.

2.2.1. Tolerancia a la salinidad en *L. vannamei*

Los juveniles de *L. vannamei* y *L. stylirostris* son, entre los Peneidos, los mejores osmorreguladores tanto a baja como a alta salinidad (Castille y Lawrence, 1981). Los juveniles y adultos de *L. vannamei* se consideran organismos eurihalinos con

capacidad de tolerar, en condiciones de laboratorio o en actividades acuícolas, salinidades que van desde 0 hasta 50 UPS (Castille y Lawrence, 1981; Pan *et al.*, 2007; FAO, 2011). Los individuos se comportan con un patrón de hipoosmorregulación en alta salinidad e hiperosmorregulación en baja salinidad. La isoosmoconformación para esta especie se ha calculado a través del punto de intersección de la línea de osmoconformación con la línea del patrón osmorregulador de la especie (o punto isosmótico) y oscila entre 714 y 779 mOsm/Kg (24.3 y 26.4 UPS) (Castille y Lawrence, 1981; Díaz *et al.*, 2001; Bückle *et al.*, 2006; Ramos-Carreño *et al.*, 2013).

La tolerancia a la baja salinidad incrementa progresivamente con la edad de los organismos (Aquacop *et al.*, 1991; McGraw *et al.*, 2002; Jayasankar *et al.*, 2009), pero se desconoce cuando empieza la tolerancia a las salinidades altas. Las investigaciones reportan que si la transferencia a la salinidad final se realiza gradualmente, PL10 y PL15 toleran durante 24h salinidades bajas de hasta 2 UPS y 1 UPS, respectivamente. Con este esquema de experimentación, la magnitud de la supervivencia incrementa en las salinidades por arriba de 1 UPS (McGraw *et al.*, 2002; Jayasankar *et al.*, 2009). La forma en la que se realiza la transferencia a la salinidad final (gradual o directa) es menos importante en etapas avanzadas (PL20 y J) (Jayasankar *et al.*, 2009) y la supervivencia de los juveniles es alta, tanto en alta como en baja salinidad (Bray *et al.*, 1994; Laramore *et al.*, 2001; Sowers *et al.*, 2006; Jayasankar *et al.*, 2009). En contraste, aunque los adultos también toleran la baja salinidad (3- 28 UPS), la supervivencia después de la transferencia directa es de 50% cuando la salinidad es por debajo de 1 UPS (Huong *et al.*, 2010).

En síntesis, la supervivencia de *L. vannamei* a diferentes salinidades depende de la edad del camarón y otros factores como la temperatura (Aquacop *et al.*, 1991; Ponce-Palafox *et al.*, 1997; McGraw *et al.*, 2002; Bückle *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2006; Jayasankar *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo las condiciones experimentales y las etapas del desarrollo que han sido evaluadas no permiten una comparación estricta e incluso reportan resultados contradictorios. Se ha reportado que la supervivencia de PL12 y PL19 aclimatadas desde 40 hacia 3 UPS no se modifica por el nivel de salinidad ni por la edad (Balbi *et al.*, 2005), pero también se ha propuesto que en poslarvas (Zhu *et*

al., 2004) el contenido iónico del agua (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) está más correlacionado con una buena supervivencia y no la salinidad total, mientras que en juveniles importa más la salinidad total que su contenido iónico (Davis *et al.*, 2002). A la fecha no existe ningún trabajo que evalúe la supervivencia en todas las etapas del desarrollo, desde larvas hasta adultos bajo el mismo esquema de experimentación (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de algunas investigaciones que evalúan la supervivencia de *L. vannamei* en diferentes salinidades.

Autor	Año	Etapas/ tamaño (g)	Salinidad inicial (UPS)	Salinidad de prueba (UPS)	Transferencia; Directa (D) ó Indirecta (I)	Tiempo	Resultado	Condiciones
Aquacop.	1991	PL2- PL20	37	2, 5, 10, 15, 20	D	Cada 2h	PL2-PL4= S=0. PL5=20% (15 UPS), 60% (20 UPS). PL10=20% (10 UPS), 80% (15 UPS), 100% (20 UPS). PL15= 60% (2 UPS), 90% (5 UPS).	Resultados generados a traves de un modelo numerico. 27 °C
Bray et al.	1994	J (1.63-2. 17)	32	5 - 49	I	35 d	S > 80% en todas las salinidades	27.3- 30.4 °C
Ponce-Palafox et al.	1997	PL18	35	20, 30, 35, 40, 50	I	40 d	S=68-95% en todas las salinidades con T entre 25-30 °C	En combinación con T °C= 20, 25, 30, 37
Samocha et al.	1998	J (2.26)	30	2, 4, 8	I	70 d	S >98%	29 °C
Laramore et al.	2001	PL30	30	0.5, 1, 1.5, 2, 3	I	18 y 40d	S=0 en =<1 UPS. S=40-60% en 2 y 3 ppt (18d) S= 20-40% en 2 y 3 ppt (40d)	30 °C
		PL25, PL30, PL40 y J	30	0,2,4,30	I	40d	PL25, PL40 y J en 0 UPS= S= 0, 0, 14%, respectivamente PL25, PL40 y J en 2 UPS = S=29, 14, 100% respectivamente PL25, PL40 y J en 4 y 30UPS = S= 86 y 100% respectivamente	25 °C
McGraw et al.	2002	PL10, 15, 20	23	0,1,2,4,8,1 2	I	24 y 48 h.	PL15-20= S>85% desde 1 UPS (48h) PL10= S>95% en 2 UPS (24 h)	23-24 °C
Palacios et al.	2004	PL20		0	D	30 min	S= 82% (3h) y 75% (24h)	sin alimento
Sower et al.	2006	J (0.79– 0.97)	32	2, 20, mezcla iones: 1:1 (smixta).	I hasta 4 UPS y luego D	53 d	S >68% en todos los tratamientos.	28.6 °C
Hurtado et al.	2006	J (3.5 – 0.5 g)	30	5, 30,50	I	21 d	S >70%, sin diferencia por suplemento de HUFAS a la dieta	25 °C y dieta HUFAS
Pan et al.	2007	PL18-20	31	22, 25, 28, 31	D	96 h	S >80%, sin efecto de pH	24 °C y pH: 7.1, 7.6, 8.1 (control), 8.6 and 9.1.
Zhang et al.	2009	J (6.91– 0.05)	35	5, 15, 25, 40	D	96 h	5 UPS= S= 12.5 % = S>80% 15-40 UPS	20 °C
Jayansakar etal.	2009	PL15	30	1 y 5	I y D	24h a 7 d	Directa= 1 y 5 UPS = S= 16 y 53%, respectivamente Indirecta= 1 y 5 UPS = S= 94 y 63%, respectivamente	28 °C
		PL20 y J (1)	30	0, 0.5, 0.75, 1.5,	D	10	PL20 = S=>50% en 1.5-5 UPS y <40% en 0-0.75 UPS J = S >60 en 0-5 UPS;	28 °C
Huong et al.	2010	A (17.6)	30	0.5, 1, 3, 7, 18, 28	I	0h - 7d (6h)	S > 50% en salinidades =>3 UPS (3d) S = 50% en <3 UPS	28 °C

2.2.2. NKA en *L. vannamei*

La presencia de la NKA se ha reportado principalmente en las branquias de *L. vannamei*. Palacios *et al.* (2004) por ejemplo demuestran que la actividad enzimática de la NKA en PL20 es mayor en las branquias posteriores que en las anteriores (similar a

los cangrejos). Mientras que Jasmani *et al.* (2010) mencionan que al menos en los adultos no existen diferencias entre anteriores y posteriores.

La actividad enzimática de la NKA en branquias tanto de PL20 como de adultos incrementa en baja salinidad. En las PL20 expuestas a la salinidad de 10 UPS el nivel es mayor a las 3h y disminuye a las 24h (Palacios *et al.*, 2004); mientras que cuando se exponen a 22, 25 o 28 UPS, el nivel más alto se registra hasta las 48h y permanece hasta las 96h (Pan *et al.*, 2007). En los adultos, el incremento más alto de la actividad enzimática ocurre a las 72h en la salinidad de 21 UPS (Pan *et al.*, 2014), e incluso hasta el 7° día en las salinidades de 3, 7 y 18 UPS (Huong *et al.*, 2010) o hasta el día 21 en adultos aclimatados a 5 UPS (Hurtado *et al.*, 2007).

La correlación de esta actividad enzimática con la abundancia de la proteína o el nivel de transcritos ha sido poco documentada. Sun *et al.* (2011) reportan que tanto el nivel de transcritos como la actividad enzimática de branquias y hepatopáncreas de adultos en baja salinidad (0.5-15 UPS) incrementan al mismo tiempo y únicamente a las 6h, para disminuir entre las 12h y 24h. En contraste, Pan *et al.* (2014) reportaron que en branquias de los adultos aclimatados a la salinidad de 21 UPS, el nivel de transcritos más alto ocurre a las 12h y permanece hasta las 24h; mientras que la mayor abundancia de la proteína ocurre antes, a las 6h, y la actividad más alta de la proteína hasta las 72h (Pan *et al.*, 2014). Por otro lado, Wang *et al.* (2012) analizaron la expresión de los transcritos de la subunidad β de la NKA en juveniles en la salinidad de 5 y 10 UPS. Estos autores reportan un incremento significativo a las 12h en las branquias y a las 6h en el hepatopáncreas; en ambos órganos los niveles descendieron hacia el final del experimento (24h) (Wang *et al.*, 2012). Se constata con esta diversidad de resultados que los niveles de expresión de la NKA dependen del nivel de salinidad a la que se expone al organismos así como el tiempo en el que se realiza la medición; asimismo no es clara la correlación entre la expresión de transcritos y de la proteína.

3. Justificación

L. vannamei es una especie de alta importancia comercial; es extensivamente cultivada a nivel global, aún en regiones fuera de los límites de su distribución natural

(FAO, 2011). Su éxito en la acuicultura se debe a su alto valor comercial, excelentes propiedades reproductivas, fuerte tolerancia a patógenos y su capacidad eurihalina (Pan *et al.*, 2007; FAO, 2011). En México, la camaronicultura de esta especie incluye la producción de poslarvas en condiciones controladas en laboratorios especializados y su crecimiento en ambientes que varían tanto en temperatura como en salinidad.

Las investigaciones enfocadas a la osmorregulación en esta especie se han concentrado en entender la respuesta de los cambios de la salinidad a nivel de la hemolinfa de las etapas adulta y juvenil (¶ 2.2.2). Existen algunas investigaciones que incluyen a las poslarvas, principalmente las PLs tardías, en evaluaciones de su supervivencia, crecimiento o alguna forma de expresión de la NKA. Todas las investigaciones que se han realizado a la fecha se han enfocado al análisis de las branquias como principal órgano osmorregulador. Sin embargo, como indican los antecedentes (¶ 1.1.2), las branquias no son el único órgano osmorregulador e incluso hay otras estructuras en la cámara branquial importantes para osmorregular que aún no se han definido para esta especie.

A la fecha, no existe ningún trabajo que evalúe el efecto de la salinidad en las etapas iniciales del desarrollo de *L. vannamei*. Particularmente se desconoce la ontogenia de su patrón osmorregulador y cuando inicia/termina la tolerancia a la alta salinidad. Tampoco se han documentado cuales son las estructuras involucradas en el mantenimiento de la osmolalidad de su hemolinfa. Es necesario determinar en qué estructuras está ubicada la función osmorreguladora como una primera aproximación al entendimiento de la osmorregulación de la especie. Este tipo de información es útil para comprender aspectos ecofisiológicos de la especie y será vital para establecer las estructuras específicas que deben ser evaluadas en futuras investigaciones para poder relacionarlas de manera adecuada con otros procesos (*e.g.* infecciones virales). Así como profundizar en el conocimiento sobre su historia de vida.

El conocimiento de las habilidades osmorreguladoras en cada etapa del desarrollo puede ser aplicado para mejorar el procedimiento de aclimatación de las poslarvas y las posibles salinidades de cultivo que puede adoptar la industria acuícola para garantizar la supervivencia. Esto es importante dado que en la acuicultura de *L.*

vannamei, las larvas y poslarvas se producen en condiciones de salinidad distintas a las que finalmente crecerán.

4. Hipótesis

El camarón blanco *L. vannamei* ajusta la osmolalidad de su hemolinfa según el nivel de salinidad; se comporta como hipoosmorregulador en alta salinidad e hiperosmorregulador en baja salinidad. Su patrón es similar al de otros camarones como *P. japonicus* y *L. stylirostris* quienes presentan un patrón de osmorregulación del tipo III, donde las larvas son osmoconformistas o ligeramente capaces de osmorregular y la última metamorfosis marca el inicio del tipo adulto de osmorregulación (Charmantier, 1998).

Las etapas larvales y adultos de *L. vannamei* están adaptados para vivir en el océano (donde la salinidad es estable) y las PLs y juveniles viven en el sistema estuarino, por lo que la eurihalinidad es reducida en las etapas larvales y adultos, pero incrementa en las poslarvas y juveniles.

Durante el desarrollo postembrionario el camarón adquiere estructuras como los epipoditos, branquiostegitos, pleura y branquias que le permiten incrementar sus habilidades osmorreguladoras, desde Zoea 3 como en *P. japonicus*. Estas estructuras contienen ionocitos bien diferenciados con microvellosidades apicales, pliegues internos en el lado basolateral, abundantes mitocondrias y la NKA. Al igual que en otros penéidos (e.g. *P. japonicus*, *P. stylirostris*) ocurre una transferencia de la función osmorreguladora entre las estructuras involucradas.

Hay diferencias morfológicas en las microvellosidades apicales y/o invaginación basolateral de los ionocitos en función de la salinidad.

La NKA es parte fundamental en el comportamiento hipo e hiperosmorregulador. Por lo que los niveles de transcritos de la NKA con respecto a la salinidad control (32 UPS) aumentan en las salinidades mayores (60, 45 UPS) o menores (20, 10, 5 UPS) al punto isosmótico.

Las etapas clave en las cuales se incrementa la capacidad osmorreguladora son evidenciadas por el aumento en la tolerancia a la salinidad y el establecimiento del

comportamiento osmorregulador típico de juveniles y adultos, en conjunto con la presencia de epitelios especializados (ionocitos con NKA) y la expresión de la NKA.

La capacidad osmorreguladora de *L. vannamei* en cada etapa del desarrollo es reflejo de su ciclo de vida.

5. Objetivos

General

Caracterizar el desarrollo de la capacidad osmorreguladora del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en las etapas larvales, poslarvales, juvenil y adulto bajo condiciones de cautiverio.

Objetivos particulares:

- 1.- Describir la ontogenia del patrón osmorregulador de *L. vannamei* y establecer el período en que el camarón alcanza la eurihalinidad y su máxima capacidad osmótica en un intervalo de salinidad de 5 a 60 UPS.
- 2.- Definir la morfología de la cámara branquial de *L. vannamei* y su topografía celular desde larva hasta adulto en condiciones de agua de mar (32 UPS).
- 3.- Caracterizar la función osmorreguladora mediante la presencia de ionocitos y la localización de la NKA en la cámara branquial de *L. vannamei* desde larva hasta adulto en condiciones de agua de mar (32 UPS).
- 4.- Evaluar la adaptación a salinidades altas y bajas desde larva hasta adulto (nivel de salinidad según la tolerancia de la etapa del desarrollo) y en la salinidad control de 32 UPS mediante la cuantificación de los niveles de expresión de los transcritos de la NKA.
- 5.- Describir el cambio en la ultraestructura celular de los ionocitos en la cámara branquial de *L. vannamei*, de larva a adulto, expuestos a una salinidad alta y baja (nivel de salinidad según la tolerancia de la etapa del desarrollo) y en la salinidad control de 32 UPS.

6.- Integrar los resultados de la tolerancia a la salinidad con el desarrollo de los epitelios osmorreguladores en la cámara branquial y los niveles de expresión de NKA.

7. Relacionar el desarrollo de las capacidades osmorreguladoras de *L. vannamei* con su ciclo de vida.

6. Materiales y Métodos generales

6.1 Material biológico: Organismos

Los camarones *L. vannamei* fueron donados por el laboratorio de producción de Poslarvas AQUAPACIFIC S.A. de C.V., localizado en Mazatlán Sinaloa, México. Las larvas y poslarvas empleadas se obtuvieron a partir de reproductores de séptima generación de un programa de selección genética diseñado para mejorar su crecimiento, fecundidad, variabilidad genética, supervivencia y tolerancia a patógenos. En este trabajo se utilizaron animales provenientes de una sola familia con la finalidad de no introducir un sesgo asociado a la varianza genética interfamiliar.

Todos los organismos fueron manipulados cuidadosamente por el personal del laboratorio de producción de poslarvas y trasladados a la unidad experimental todos los días por la mañana. Los juveniles y adultos fueron seleccionados por el personal de la granja acuícola al momento de presentar una cutícula resistente; en larvas y poslarvas la etapa de muda no fue asignada, pero las muestras se tomaron entre 10 y 12 horas después de la muda (la cual ocurre por la noche). La etapa del desarrollo de las larvas y la etapa de muda fase C en juveniles y adultos se confirmaron por observaciones en un microscopio óptico según lo descrito por Kitani (1986) y Rodríguez-Pérez *et al.* (2006), respectivamente.

6.2. Diseño experimental

La empresa AQUAPACIFIC S.A. de C.V. proporcionó también toda el agua de mar utilizada, la cual fue obtenida a través de un sistema de tubería sumergido 12 metros por debajo del nivel medio del mar en frente de las instalaciones de la empresa (El Rosario, Mazatlán, Sinaloa). El agua es filtrada con microfiltros (1 μm), ozonificada,

oxigenada y tratada con luz UV antes de su uso. Las salinidades altas se obtuvieron mediante la adición de sal marina de Guerrero Negro al agua de mar y las salinidades bajas por diluir el agua de mar con agua purificada local. Las salinidades experimentales fueron preparadas continuamente y almacenadas durante un máximo de dos días en contenedores de 60 L. La salinidad fue ajustada en mOsm/Kg con un osmómetro de punto de congelación (Advanced Instruments 3320, Massachusetts). En el presente trabajo la salinidad se expresó en UPS o como osmolalidad en mOsm/Kg.

El método experimental consistió en transferir directamente a los camarones desde la salinidad de 30-34 UPS a las seis salinidades de prueba. Previo a la transferencia los animales se aclimataron a una temperatura de 25 ± 1 °C por 30 min, para esto se utilizó hielo en doble bolsa ziploc. Los experimentos se realizaron bajo las siguientes condiciones: aireación constante, fotoperiodo 12h Luz: 12h Oscuridad y temperatura de 25 ± 1 °C ajustada y mantenida con calentones eléctricos de titanio de 200 watts. Los camarones no se alimentaron durante el experimento. El tamaño de las unidades experimentales (u.e.) estuvo en función del tamaño de los animales y del experimento. Para determinar la supervivencia, las larvas, poslarvas, juvenil y adulto se mantuvieron en recipientes de 1, 10, 40 y 700 L, respectivamente. Para la determinación de la expresión génica y proteica de la NKA y para la cuantificación de la osmolalidad de la hemolinfa se utilizaron recipientes de 20 a 60 L en todas las etapas. La experimentación se realizó por etapa del desarrollo, es decir, en un sólo experimento se evaluaron las seis salinidades de prueba.

7. Capítulo I. Eurihalinidad y patrón osmorregulador de *L. vannamei* (Boone, 1931) de larva hasta adulto.

7.1. Introducción

La eurihalinidad es la capacidad de los animales para vivir en un amplio intervalo de salinidades. La supervivencia en ambientes de salinidad variable implica la capacidad para mantener la concentración u osmolalidad de la hemolinfa en valores adecuados para el buen funcionamiento del organismo. Así los límites de eurihalinidad están dictados por la capacidad de los organismos para compensar la pérdida o ganancia de sales y agua (Mantel y Farmer, 1983). Los crustáceos han desarrollado estrategias limitantes y compensatorias que les permiten regular la osmolalidad de su hemolinfa. Presentan distintos patrones osmorreguladores y capacidades osmóticas (CO) que dependen de la especie y pueden variar en la ontogenia (Péqueux, 1995; Charmantier y Charmantier-Daures, 2006).

El camarón *L. vannamei* tiene un ciclo de vida que incluye dos hábitat distintos en salinidad; el océano vs el estuario. Las etapas larvales y los adultos pueden considerarse estenohalinos dado que viven en el océano, donde la salinidad es estable, mientras que las etapas poslarvales y juveniles deben tener cierta capacidad eurihalina para vivir en los estuarios. Esto se ha demostrado de manera puntal en algunas etapas del desarrollo y salinidades. Esta especie en su etapa juvenil y adulta tiene un comportamiento hiper-hipo osmorregulador (Bückle *et al.*, 2006; Ramos-Carreño *et al.*, 2013), sin embargo, se desconoce cómo sucede la osmorregulación de esta especie en sus diferentes etapas del desarrollo. Por ello, en este capítulo se describe la ontogenia del patrón osmorregulador y su capacidad osmótica, y se define la etapa del desarrollo en la que se establece la eurihalinidad.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Tolerancia a la salinidad

Se evaluó la supervivencia de 19 etapas del desarrollo de *L. vannamei* (desde Nauplio hasta adulto; Tabla 2) en seis salinidades (5, 10, 20, 45 y 60 UPS), incluyendo

la salinidad control de 32 UPS. Para cada tratamiento se utilizaron tres réplicas de las u.e. en larvas y PLs y dos en juveniles y adultos. La etapa Mysis 1 fue evaluada dos veces.

Tabla 2. Etapas del desarrollo evaluadas durante el experimento de supervivencia. Se indican la talla en mm (media \pm SEM), volumen de la unidad experimental (u.e) en litros, el número de organismos al inicio del experimento y la abreviación utilizada en las poslarvas, en donde el número corresponde al día de crecimiento poslarval.

Etapa del desarrollo	Tamaño (mm)	N inicial	Capacidad de la u.e (volumen de agua)
Nauplio 2	0.4 \pm 0.15	110	
Nauplio 6	0.5 \pm 0.03	116	
Zoea 3	1.4 \pm 0.03	117	1 (0.75)
Mysis 1	3.2 \pm 0.08	106	
Mysis 2	sin dato	106	
Mysis 3	sin dato	106	
Poslarva 1 (PL1)	5 \pm 0.05	112	
Poslarva 2 (PL2)	6.2 \pm 0.08	103	
Poslarva 3 (PL3)	6.3 \pm 0.07	110	
Poslarva 4 (PL4)	6.8 \pm 0.07	104	
Poslarva 5 (PL5)	7.2 \pm 0.09	106	
Poslarva 7 (PL6)	7.4 \pm 0.10	105	10 (5)
Poslarva 12 (PL12)	9.2 \pm 0.17	82	
Poslarva 15 (PL15)	sin datos	53	
Poslarva 17 (PL17)	sin datos	50	
Poslarva 19 (PL19)	11.8 \pm 0.26	52	
Poslarva 22 (PL22)	12 \pm 0.33	51	
Poslarva 27 (PL27)	17 \pm 0.56	41	
Juvenil	6 \pm 0.18 (1g)	20	40 (30)
Adulto	21 \pm 0.35	12	700 (400)

Se obtuvo la supervivencia a las 5, 12, 24 y 48 h posteriores a la transferencia directa. La supervivencia se estableció por la presencia de movimiento y el latido del corazón observado en un microscopio estereoscópico en larvas y PLs. El valor de supervivencia se calculó para cada condición experimental y etapa del desarrollo en cada momento de muestreo (5, 12, 24 y 48h), y se expresó como porcentaje; $S\% = (\text{número final de camarones vivos/número inicial de camarones})/100$. La eurihalinidad o máxima tolerancia se estableció mediante los límites de supervivencia \geq a 20% a las 5h después de la transferencia a las salinidades experimentales.

Los porcentajes de supervivencia fueron normalizados con la función arcoseno. Las diferencias entre etapas del desarrollo se evaluaron con un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y una prueba Tukey *a posteriori*, con un valor de significancia α de 0.05. Las comparaciones se realizaron con el paquete estadístico Prism Graphpad versión 5.0a para Mac OS X (San Diego, California USA). Los datos se muestran sin transformar (media \pm SEM).

7.2.2. Patrón osmorregulador y capacidad osmótica

El patrón osmorregulador y la capacidad osmótica (CO) se evaluaron en etapas del desarrollo seleccionadas (Nauplio 2, Zoea 3, Mysis 2, PL1, PL2, PL4, PL15, juvenil y adulto) en las salinidades experimentales que previamente toleró cada una, incluyendo la salinidad control de 32 UPS. El experimento duró 24h.

La osmolalidad de la hemolinfa se obtuvo mediante la cuantificación de la presión osmótica de la hemolinfa en las etapas M2, PL1, PL2, PL4, PL15, J y A. En las etapas N3 y Z3 no fue posible la obtención de la hemolinfa debido a su tamaño pequeño.

Para la extracción de la hemolinfa se siguió el procedimiento descrito en Charmantier (1998). Las larvas y PLs fueron lavadas en agua destilada, secadas cuidadosamente con papel filtro y transferidas rápidamente a un recipiente de vidrio con aceite inmersión, con la finalidad de evitar la evaporación y disminuir el movimiento. Los juveniles y adultos únicamente se secaron con papel filtro. La muestra de hemolinfa (aprox. 20 nL) se extrajo directamente del corazón en larvas y PLs con un capilar de vidrio modificado y con una jeringa de insulina de 1 mL en juveniles; en adultos la hemolinfa se obtuvo del seno ventral con una jeringa de insulina de 1 mL.

Se obtuvo la osmolalidad de la hemolinfa y del tratamiento salino antes de la transferencia de los animales a las distintas salinidades, y después de 12 y 24h. La presión osmótica en larvas y PLs fue medida con un nanoosmómetro (Otago Osmometer, New Zealand) y en juveniles y adultos con un microosmómetro (Advanced Instruments Osmometer 3320, Massachusetts) en por lo menos seis animales. Los valores del nanoosmómetro (Tf; Temperatura de fusión) fueron transformados con la fórmula de osmolalidad = $(Tf / 1.85) \times 1000$. Esto no fue necesario con el microosmómetro ya que el equipo arroja valores directos en osmolalidad.

Para determinar el patrón osmorregulador de cada etapa del desarrollo se realizó un Análisis de Regresión Lineal considerando la osmolalidad de la hemolinfa en función de la osmolalidad del medio experimental. De acuerdo a Ferraris *et al.* (1986), la pendiente de la curva de regresión refleja la capacidad para osmorregular y un valor de 1 indica osmoconformación.

Paralelamente se determinó la capacidad osmótica (CO) en cada etapa del desarrollo. La CO es la diferencia entre la osmolalidad de la hemolinfa y el ambiente a determinada salinidad. El comportamiento de hiperosmorregulación ocurre cuando el valor de la CO es positivo en baja salinidad y el comportamiento de hipoosmorregulación cuando es negativo en alta salinidad. El punto isosmótico (PI) fue obtenido con base en el punto de intersección de la línea de isoosmoconformación con la línea de regulación osmótica calculada para cada etapa del desarrollo.

Los valores de osmolalidad fueron normalizados con la función raíz cuadrada. Las CO en cada etapa del desarrollo y entre etapas se evaluaron con un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y una prueba Tukey *a posteriori*. Todos los análisis se contrastaron con un valor de significancia α de 0.05. Las comparaciones se realizaron con el paquete estadístico Prism Graphpad versión 5.0a para Mac OS X (San Diego, California USA). Los datos se muestran sin transformar (media \pm SEM).

7.3. Resultados

7.3.1. Tolerancia a la salinidad

La tolerancia a la salinidad incrementó progresivamente con la edad de los organismos (Fig. 9). Las etapas larvales (Nauplios, Zoea y Mysis) y la primer poslarva únicamente toleraron las salinidades de 20, 32 y 45 UPS. Esta tolerancia incrementó en PL2 y PL3 con supervivencia $>20\%$ en la salinidad de 10 UPS. En PL4 se detectó la máxima tolerancia a la salinidad baja evaluada en este estudio (5 UPS). Posteriormente, en PL22, se adquirió la tolerancia a la alta salinidad (60 UPS) (Fig. 9).

La etapa Mysis 1 toleró la salinidad de 10 UPS mientras que las etapas posteriores (Mysis 2, Mysis 3 y PL1) no toleraron esa salinidad. Esto se evaluó dos veces con los mismos resultados.

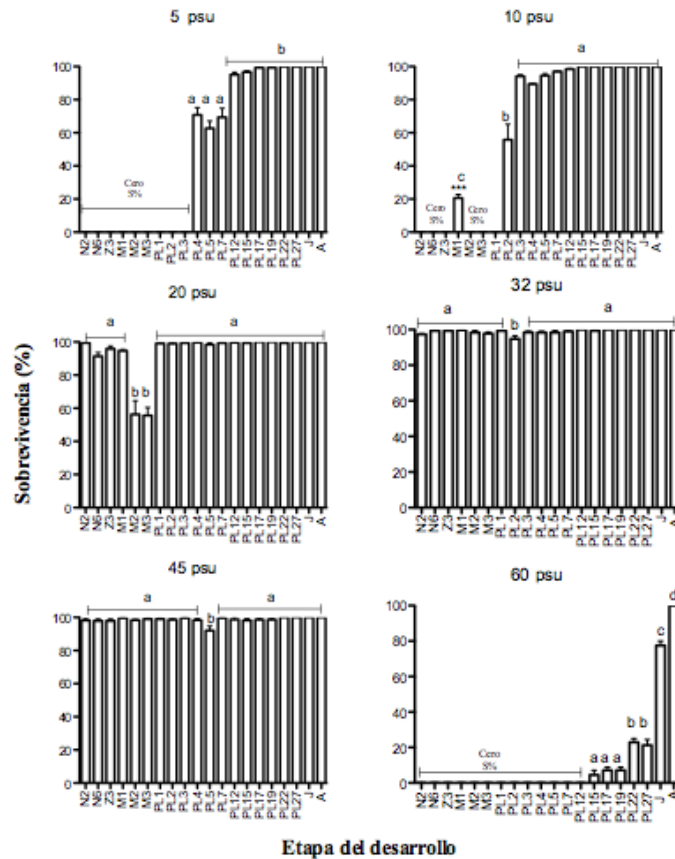


Figura 9. Supervivencia en las etapas del desarrollo evaluadas de *L. vannamei* a las 5 hps. N2, nauplio 2; N6, nauplio 6; Z3, zoea 3; M1, 2, 3 son respectivamente mysis 1, 2, y 3. PL1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 15, 19, 22 y 27 corresponden a las etapas postlarvales, el número indica los días después de la metamorfosis. Las etapas se consideraron tolerantes con supervivencia mayor o igual a 20%. Las barras con diferente letra son significativamente diferentes ($p=0.05$).

7.3.2. Patrón osmorregulador y CO

La osmolalidad de la hemolinfa entre las 12 y 24h no fue significativamente diferente, por lo que únicamente se analizaron los datos de las 24h. La pendiente de la curva calculada para cada etapa del desarrollo fue disminuyendo con la edad del camarón. En Mysis 2 la pendiente fue muy cercana a uno (0.893 ± 0.017) y estadísticamente diferente a las pendientes de las postlarvas. Los juveniles y adultos presentaron las pendientes menos pronunciadas y significativamente diferentes a las calculadas para las postlarvas (Fig. 10).

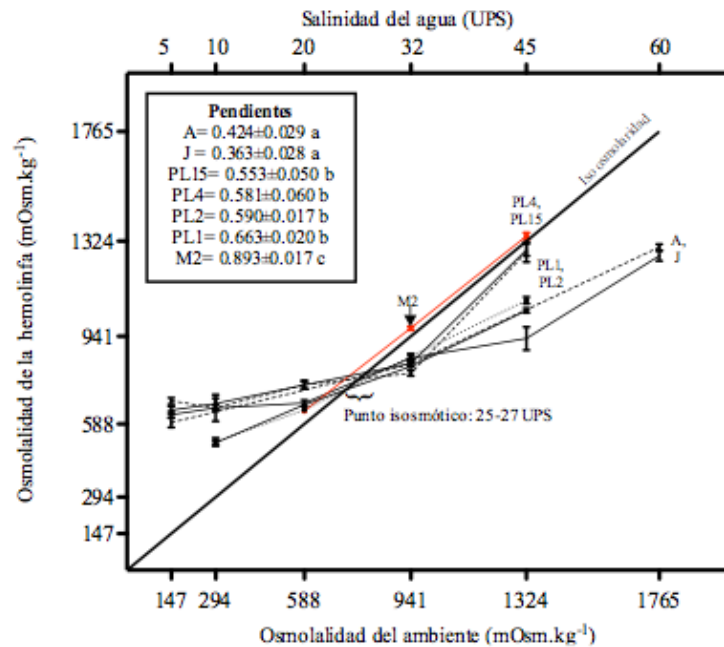


Figura 10. Ontogenia del patrón de osmorregulación de *L. vannamei* a las 24 h en etapas seleccionadas. M2, mysis 2; PL1, poslarva 1; PL2, poslarva 2; PL4, poslarva 4; PL15, poslarva 15; J, juvenil; A, adulto. La grafica muestra el intervalo de los puntos isosmóticos para todas las etapas, excepto para M2.

La CO de Mysis 2 fue positiva en todas las salinidades evaluadas; esto junto a la pendiente cercana a uno sugieren que esta etapa presenta un patrón de hiperosmoconformación. A partir de PL1 el patrón osmorregulador cambió al comportamiento hipoosmorregulador en las salinidades altas e hiperosmorregulador en las salinidades bajas (Fig. 11). Por lo tanto, la ontogenia del patrón osmorregulador de *L. vannamei* es del tipo III.

En todas las etapas del desarrollo la CO varió por la salinidad *per se*, y fue menor en las salinidades más próximas al PI. Excepto por Mysis 2, las menores CO ocurrieron en la salinidad de 20 UPS. Resaltó que en una misma salinidad se registraron CO similares entre la mayoría de las etapas del desarrollo, por ejemplo con respecto a la etapa juvenil (etapa con mayor tolerancia) la CO en la salinidad de 5 UPS fue significativamente igual con la de PL4 y con la de PL1 en la salinidad de 45 UPS (Fig. 11).

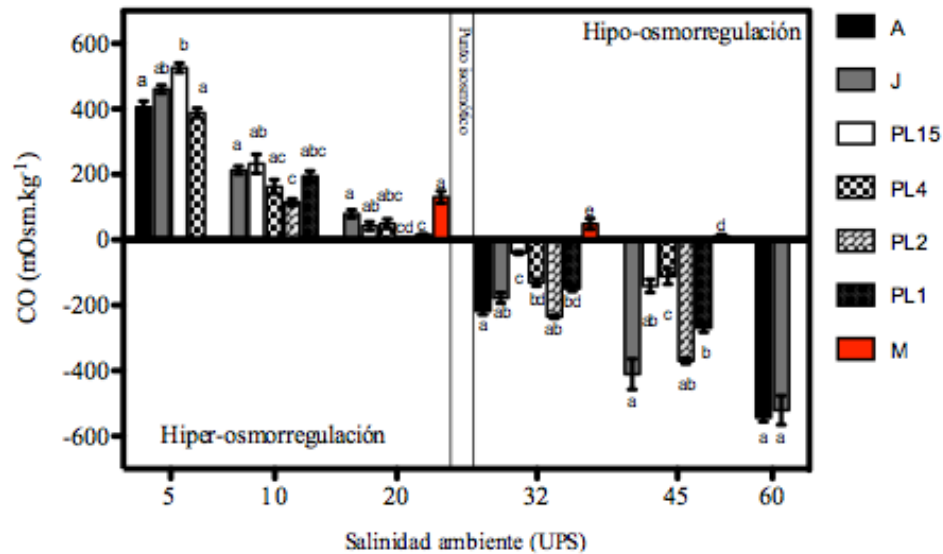


Figura 11. Capacidad osmótica de *L. vannamei* en etapas seleccionadas a las 24 h pso. M, mysis 2; PL1, poslarva 1; PL2, poslarva 2; PL4, poslarva 4; PL15, poslarva 15; J, juvenil; A, adulto. CO, capacidad osmótica. Las barras con diferente letra indican diferencias significativas ($p=0.05$).

7.3.3. Supervivencia a las 48h

La supervivencia de los animales durante todo el experimento (48h) en la salinidad de 32 (control) se mantuvo en más del 80%, excepto para las poslarvas PL1-5 cuya supervivencia disminuyó ligeramente al final del experimento y estuvo entre 80 y 60% (Fig. 12d). En la salinidad de 5 UPS la supervivencia de las etapas poslarvales (PL4-PL7) fue del 50%, mientras que la de las PLs más grandes y juveniles fue de más del 80%. En esta salinidad fue claro una drástica disminución de los adultos a las 12h con un solo organismo vivo a las 48h (Fig. 12a). En la salinidad de 10 UPS se registró 75% de supervivencia en la mayoría de las etapas, sólo en PL2 y PL3 se registraron supervivencias de entre 22 y 45%. Destacó que en esta salinidad la supervivencia de Mysis 2 fue casi cero desde las 12h. Contrario a las supervivencias en la salinidad de 32 UPS, la supervivencia en la salinidad de 20 UPS fue alta (80%) y más constante entre las PLs, únicamente las etapas de Mysis (1-3) presentaron supervivencias de 50% (Mysis 2) o 20% (Mysis 1 y Mysis 3) (Fig. 12c). La supervivencia en la salinidad de 45 UPS fue variable entre las etapas y destacó que sólo 10% de PL1 y PL3 se mantuvieron vivos a las 48h (Fig. 12e). En la salinidad de 60 UPS la supervivencia de los organismos disminuyó drásticamente después de las 5h. Los adultos no supervivieron durante 48h

mientras que sólo la mitad de los juveniles supervivieron en esta salinidad (Fig. 12f).

En la salinidad de 45 UPS se observó un comportamiento de hiperactividad y canibalismo en las etapas postlarvales iniciales (PL1-PL7), mientras que en Mysis 2 y en el adulto se observó una protuberancia sobre el cefalotórax en la salinidad de 20 y 5 UPS, respectivamente (Fig. 13).

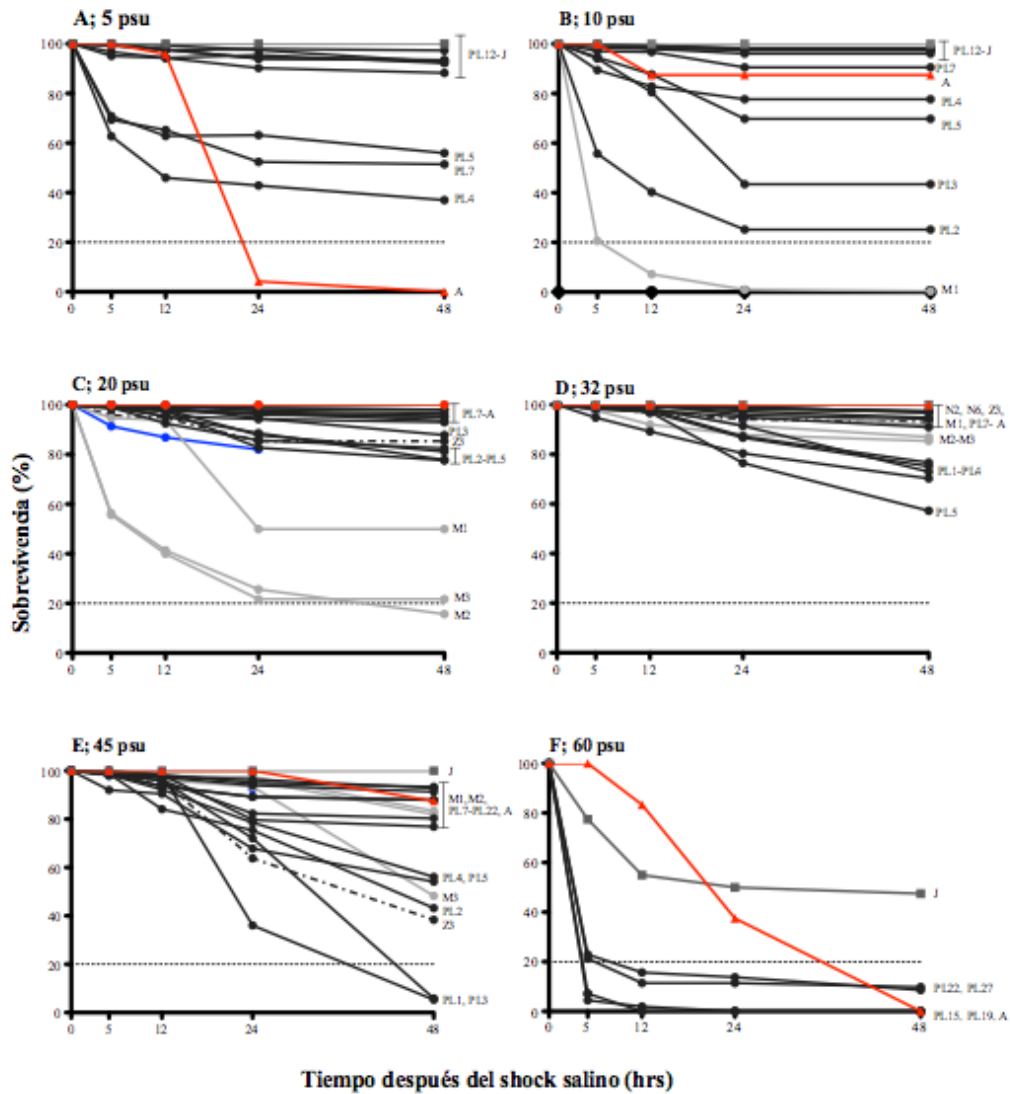


Figura 12. Supervivencia de *L. vannamei* en las seis salinidades de prueba durante 48 h pso. A, 5 UPS; B, 10 UPS; C, 20 UPS; D, 32 UPS; E, 45 UPS; F, 60 UPS. Cada línea o grupo de líneas corresponde a cada etapa del desarrollo. La línea punteada indica la supervivencia de 20% en cada salinidad. N2, nauplio 2; N6, nauplio 6; Z3, zoea 3; M1, 2, 3 son respectivamente mysis 1, 2 y 3. PL1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 15, 19, 22 y 27 corresponden a las etapas postlarvales, el número indica los días después de la metamorfosis.

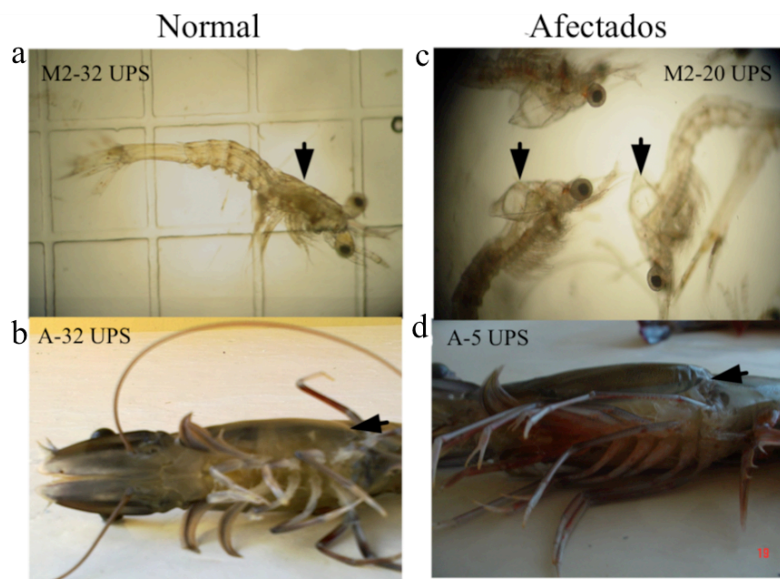


Figura 13. Anormalidades anatómicas de *L. vannamei* al final del experimento. a, M2 en 32 UPS; b, vista ventral del cefalotórax del adulto a 32 UPS; c, M2 en 20 UPS; d, vista ventral del cefalotórax del adulto a 5 UPS. La flecha indica la protuberancia en el cefalotórax de M2 (Mysis 2) y A (adulto) en 20 y 5 UPS, respectivamente.

7.4. Discusión

Los patrones osmorreguladores son estrategias adaptativas de los crustáceos. La regulación de la osmolalidad de la hemolinfa depende de la especie y puede variar durante su ontogenia (Péqueux, 1995; Charmantier, 1998). En este estudio se determinó que la ontogenia del patrón osmorregulador de *L. vannamei* es del tipo III, en el cual, la última metamorfosis marca el inicio del tipo adulto de osmorregulación (Charmantier, 1998). En esta especie el cambio de la hiperosmoconformación (en la etapa larval) al patrón hiper-hiposmorregulador en la primer poslarva implica que desde esta etapa del desarrollo tienen la capacidad para regular, de alguna manera, la osmolalidad de la hemolinfa según la salinidad ambiental. No obstante, con base en la prueba de pendientes se demostró que esta capacidad es limitada y se incrementa progresivamente hacia etapas más avanzadas del desarrollo (pendientes cercanas a 0).

En especies con un ciclo de vida bifásico ocurren cambios radicales en cuanto al hábitat y estilo de vida que implican cambios dramáticos en las funciones vitales durante la ontogenia (Anger, 2006). Por lo que posiblemente el cambio del patrón osmorregulador en *L. vannamei* está relacionado con el proceso de desarrollo

determinado para adquirir la capacidad de hiper-hiposmorregular como una función vital que le permite a la especie completar su ciclo de vida, ya que las etapas poslarvales se reclutan a los estuarios donde se enfrentan a variaciones en la salinidad del agua (FAO, 2004). En las langostas del género *Homarus* se ha sugerido que el cambio en el patrón osmorregulador está asociado a los cambios morfológicos y etológicos que suceden durante su desarrollo y que están relacionadas con el hábitat (Charmantier *et al.*, 1991). Por lo que es muy probable que la capacidad de osmorregular observada en *L. vannamei* esté relacionada con el desarrollo de estructuras (epitelios y ionocitos) y del mecanismo molecular específico para osmorregular. El patrón osmorregulador tipo III se ha descrito también en otros crustáceos que presentan ciclo de vida bifásico como el de *L. vannamei*, tales como *P. japonicus* (Charmantier *et al.*, 1988), *L. stylirostris* (Pham *et al.*, 2012b) y *C. Crangon* (Cieluch *et al.*, 2005).

Con respecto a la tolerancia a la salinidad, las etapas larvales y la primer poslarva de *L. vannamei* demostraron cierta capacidad eurihalina al tolerar salinidades de 20 a 45 UPS, niveles distintos a la salinidad estable promedio de los océanos (34 UPS) donde viven y se desarrollan (FAO, 2004). La tolerancia a la salinidad más baja evaluada en este estudio (5 UPS) se observó desde PL4, mientras que la tolerancia a la salinidad más alta evaluada (60 UPS) ocurrió en PL22. Dado que la tolerancia se determinó en cada etapa del desarrollo desde PL2 a PL4 (Tabla 2), se sugiere que PL4 y entre PL20 y PL22 se desarrollan las capacidades osmorreguladoras. Muy probablemente entre estas etapas poslarvales se establecen las estructuras, epitelios y el mecanismo molecular para osmorregular de manera eficiente en salinidades extremas. Lo cual les permitirá reclutarse al sistema estuarino para continuar su desarrollo y crecimiento, dado que esto ocurre cuando los animales tienen las habilidades para adaptarse funcionalmente a estos ambientes dinámicos (McKenney y Celestial, 1995).

La habilidad de *L. vannamei* para sobrevivir durante las 48h del experimento varió con la etapa del desarrollo. Las mortalidades a través del tiempo en las salinidades que previamente toleraron ($S \geq 20\%$ durante 5h) se atribuyen al déficit energético que conlleva el mantenerse osmorregulando y sin recibir alimento. El efecto de la inanición bajo estrés osmótico ha sido demostrado en PL20, en esa etapa la magnitud de la

supervivencia es baja en animales que no se han alimentado (Palacios *et al.*, 2004). Por otro lado, durante el desarrollo larval y poslarval ocurre el acrecentamiento de otros sistemas como el digestivo (Abrunhosa y Melo, 2008) y el reproductor (Garza-Torres *et al.*, 2009), esto junto al progreso de los órganos osmorreguladores requieren un consumo elevado de energía que afecta su supervivencia.

El efecto de las salinidades fue muy notable en la morfología de las etapas de Mysis y en adultos. La protuberancia que se observó en la región del cefalotórax en Mysis (Fig. 13c) posiblemente este relacionada con la poca o inexistente habilidad para absorber iones y regular la osmolalidad de su hemolinfa y evitar la entrada excesiva de agua. Otro evento notable fue la casi nula supervivencia de los adultos en 5 UPS (24 hps) y en 60 UPS (48 hps) mientras que los juveniles sí sobrevivieron a estas salinidades. La protuberancia observada en los adultos en la salinidad de 5 UPS (Fig. 13d) pudiese estar relacionado con un mayor impacto del estrés osmótico en la fisiología del animal considerando la etapa avanzada del desarrollo y el estado reproductivo. Sin embargo, existe también la posibilidad de que los adultos pierdan parte de su capacidad osmorreguladora debido a que viven en ambientes estenohalinos como se ha sugerido en otros Peneidos (*Penaeus monodon*, *Penaeus merguensis*, *Penaeus plebejus*, *Penaeus esculentus* y *Metapenaeus bennettiae*) (Dall, 1981; Cawthorne *et al.*, 1983).

La eurihalinidad de *L. vannamei* observada en este trabajo es mayor a la reportada para *L. stylirostris* y *P. japonicus*. La supervivencia de la PL4 de *L. vannamei* fue de más del 50% en la salinidad de 5 y 10 UPS, mientras que la salinidad letal reportada para PL4 de *L. stylirostris* es de 17 UPS (Pham *et al.*, 2012b) y la salinidad letal para *P. japonicus* en la edad de PL2 - PL6 es de 10 UPS (Charmantier *et al.*, 1988). Es decir, el camarón blanco tolera más la baja salinidad. En este trabajo se corroboró que la tolerancia a la baja salinidad incrementa progresivamente desde PL2, sin embargo se encontraron diferencias con respecto a las etapas clave reportadas por Aquacop *et al.* (1991) para la misma especie. La PL2 y PL3 toleraron la salinidad de 10 UPS y PL4 fue capaz de tolerar la salinidad de 5 UPS, mientras que en el estudio de Aquacop *et al.* (1991) las poslarvas de 2 y 4 días únicamente toleraron la salinidad de 20 UPS y es hasta entre PL11 y 12 que toleraran la salinidad de 5 UPS. Los resultados de la presente

investigación coinciden con el reporte de Jayasankar *et al.* (2009) quienes reportan alta supervivencia de PL15 y juvenil en 5 UPS. Coinciden también con los registros de alta supervivencia de PL22 en salinidades de 22, 25 y 28 UPS reportados por Pan *et al.* (2007).

Por otro lado, el punto isosmótico (PI) obtenido para *L. vananmei* fue de entre 25 y 27 UPS (735.3 y 794.2 mOsm/Kg) en las diferentes etapas del desarrollo evaluadas, lo que sugiere que los PI son relativamente constantes a lo largo de la ontogenia como se ha propuesto para la langosta *M. rosenbergii* (Singh, 1980). Los PI calculados para *L. vannamei* son similares a los que se han reportado previamente para juveniles y adultos (Castille y Lawrence, 1981; Bückle *et al.*, 2006; Ramos-Carreño *et al.*, 2013).

Los PI son una medida calculada para conocer la salinidad a la cual el animal gasta menor energía en la osmorregulación y por consiguiente se puede obtener un mayor crecimiento. En esta investigación se observó que en las salinidades donde hay supervivencias altas (20 y 32 UPS), y más homogéneas entre las etapas del desarrollo durante las 48h que duró el experimento la CO fue menor. Esto significa que la osmolalidad de la hemolinfa y la del medio externo son similares y por lo tanto el mecanismo osmorregulador está menos implicado, hay un menor gasto energético y puede ser más favorable el crecimiento. No obstante se deben considerar dos cosas:

1) la osmolalidad es reflejo de la concentración de la hemolinfa y está reportado que el contenido iónico, por lo menos en poslarvas, afecta el crecimiento en esta especie (Zhu *et al.*, 2004), por lo tanto deberá considerarse si el contenido iónico en las salinidades de interés es el adecuado para alcanzar los crecimientos deseados. Por otro lado, en *M. rosenbergii* se reporta que el crecimiento en la salinidad del PI no es el mejor (Singh, 1980) mientras que en *L. vannamei* se reporta por un lado, que las tasas de crecimiento son más altas en salinidades fluctuantes (Feng *et al.*, 2008), y por el otro que es preferible el cultivo en la salinidad estable del PI del camarón (Valdéz *et al.*, 2008).

2) La CO es una medida muy sensible a cambios en la temperatura, etapa de muda, estado nutricional etc., por lo que se considera un biomarcador poco específico (Lignot *et al.*, 2000). Por ello deberá ser obtenida mediante experimentos que no permitan ningún sesgo por otras variables, incluso los individuos en las etapas

poslarvales deben mantenerse separadas para evitar el canibalismo, ya que esto los pone en un estado nutricional diferente y será más compleja la interpretación de los resultados. Posiblemente por esto las etapas PL4 y PL15 presentaron CO muy distintas a las del resto de las etapas en la misma salinidad, en particular en la salinidad de 45 se observó mucho canibalismo.

Finalmente es pertinente remarcar que en este trabajo se evaluó la eurihalinidad fisiológica y estos resultados deben considerarse como un indicador de la respuesta a corto plazo para regular la osmolalidad de la hemolinfa y evitar la muerte. El estrés osmótico causa una disminución en las capacidades y eficiencias de asimilación y conversión de energía para el desarrollo de los tejidos (Anger, 2003), por lo que la supervivencia en salinidades distintas a las de su hábitat no implica que las larvas o poslarvas manifiesten un desarrollo morfológico adecuado. Además considerando que en otras especies como *L. stylirostris* se ha reportado que la capacidad osmorreguladora se puede modificar según las condiciones en las que los progenitores se desarrollen (Chim *et al.*, 2003), sería interesante explorar si la eurihalinidad registrada en este estudio no es un efecto de plasticidad fenotípica adquirida por la población de *L. vannamei* en cautiverio. Asimismo, será interesante evaluar la supervivencia y el crecimiento en condiciones reales de cultivo (es decir, con alimentación) para verificar que las larvas y poslarvas iniciales tengan un buen desarrollo y crecimiento.

7.5. Resumen del capítulo I

- ◆ La ontogenia del patrón osmorregulador de *L. vannamei* es del tipo III, es decir el patrón hiper-hiposmorregulador se desarrolla en la primer etapa poslarval.
- ◆ La Capacidad Osmótica en la salinidad de 5 UPS es igual entre PL4 y juvenil.
- ◆ La Capacidad Osmótica en la salinidad de 45 es igual entre PL1 y juvenil.
- ◆ Las etapas larvales Nauplio, Zoea y la primer poslarva (PL1) de *L. vannamei* toleran las salinidades de 20, 32 y 45 UPS con supervivencias de 90%.
- ◆ La etapa Mysis tolera las salinidades de 32 y 45 UPS con supervivencias de 90% y la salinidad de 20 en 60%.

- ◆ A partir de la etapa PL2 se tolera la salinidad de 10 UPS con una supervivencia de 50%.
- ◆ La etapa PL4 marca el inicio de la tolerancia a la salinidad de 5 UPS con una supervivencia de 60%.
- ◆ La tolerancia a la salinidad de 60 UPS se inició en poslarvas más grandes (PL22) con una supervivencia de 22%.
- ◆ La supervivencia a las 48h fue menor al 10% en PL1 y PL3 en la salinidad de 45 UPS así como en PL15 y PL19 en la salinidad de 60 UPS y en los adultos en la salinidad de 5 y 60 UPS.

Artículo 1. “Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development”. **2014.** Jennyfers Chong-Robles, Guy Charmantier, Viviane Boulo, Joel Lizárraga-Valdéz, Luis M. Enríquez-Paredes, and Ivone Giffard-Mena. *AQUACULTURE* (422-423) 261-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.034>.

8. Capítulo II. Descripción de la cámara branquial de *L. vannamei*: presencia de ionocitos y función osmorreguladora.

8.1. Introducción

Una de las estrategias que utilizan los crustáceos para mantener la osmolalidad de la hemolinfa es el transporte activo (estrategia compensatoria) para la absorción o excreción de iones en estructuras especializadas (Mantel y Farmer, 1983). Este proceso está basado en la funcionalidad de células especializadas en el transporte iónico o ionocitos, las cuales se distinguen por su ultraestructura celular y la presencia de proteínas de transporte como la ATPasa Na^+/K^+ en la parte basolateral de la célula (Péqueux, 1995).

La ubicación de ionocitos con base en técnicas como la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para localizar la NKA y la Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) han permitido dar seguimiento a los diferentes órganos efectores durante el desarrollo de algunas especies. Estos tipos celulares se han reportado en las estructuras de la cámara branquial (G, E, Br, Pl) y en la glándula antenal (GA) del langostino *M. amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013). La participación de estas estructuras en la osmorregulación depende de la especie y de la etapa del desarrollo. Por ejemplo, en el cangrejo *C. maenas*, las branquias posteriores son las únicas estructuras con función en la osmorregulación y la función se establece tan pronto se desarrollan las branquias (en la etapa de megalopa) (Cieluch *et al.*, 2004). Mientras que en el langostino *M. amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013), la langosta *H. gammarus* (Lignot y Charmantier, 2001) y los camarones *C. crangon* (Cieluch *et al.*, 2005), *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994) y *L. stylirostris* (Pham *et al.*, 2012a) se ha descrito una transferencia de la función osmorreguladora entre las estructuras involucradas durante el desarrollo de los organismos. La participación de cada estructura depende de la especie e incluso de la salinidad.

En los camarones que poseen branquias del tipo dendobranquia (*P. japonicus* y *L. stylirostris*), la pleura y los branquiostegitos son las estructuras osmorreguladoras en las etapas larvales, posteriormente, en las etapas poslarvales la pleura pierde su función

y se transfiere a los epipoditos. En las etapas juveniles de ambas especies (Bouaricha *et al.*, 1994; Pham *et al.*, 2012a) y además en la langosta *H. gammarus* (Lignot y Charmantier, 2001), los branquiostegitos y los epipoditos son las principales estructuras osmorreguladoras.

L. vannamei es una especie que se desarrolla por etapas (Kitani, 1986), sin embargo, se desconoce cómo es el desarrollo de las estructuras o cómo se correlacionan la ultraestructura celular y la presencia de la NKA en sus diferentes etapas del desarrollo. Por ello, en este capítulo de la tesis se integran diferentes aproximaciones metodológicas (observaciones visuales al desarrollo de la cámara branquial, topografía celular, IFI y MET) para caracterizar el desarrollo de las estructuras de la cámara branquial y su papel en la osmorregulación.

8.2. Materiales y Métodos

Los organismos que se emplearon para llevar a cabo la IFI y la MET se mantuvieron en recipientes de plástico adecuados a su tamaño y bajo las mismas condiciones experimentales explicadas anteriormente (§ 6.2) a una salinidad de 32 UPS y durante 24h. La descripción de la topografía celular y la determinación de la fórmula branquial se realizó en individuos obtenidos de este experimento y de algunos que se tomaron directamente de los estanques de cultivo (salinidad 32-34 UPS). Se conservaron entre 10 y 50 animales completos de cada etapa del desarrollo de la salinidad de 32 UPS y de los estanques de cultivo. Para el análisis de MET de las etapas PL15, J y A se conservó el 3er conjunto de G-E y el Br.

Los animales se fijaron completos en solución de Davidson para la tinción Hematoxilina y Eosina (H-E) y para la IFI. La fijación duró 12h en larvas y PL's y 24h en juveniles y adultos; posteriormente se preservaron en alcohol 70%. (Lightner, 1996) y a temperatura ambiente (18-20 °C). Las muestras se preservaron durante 6 meses hasta la continuación del proceso en los Laboratorios de Ecología Molecular (LEM) e Histología de la UABC.

8.2.1. Análisis morfológico de la cámara branquial y su estructura celular

La fórmula branquial corresponde al número de branquias y epipoditos en una cámara branquial. Se obtuvo mediante la observación de los camarones en un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi SV11; Carl Zeiss. En algunas etapas de larvas y PL's se utilizó aceite de inmersión o azul de metileno (0.1%) para facilitar la manipulación y observación de los animales. Se observaron organismos de las etapas Mysis 1, PL1, PL5, PL6, PL9-13, PL15, PL22, PL39 (n=10) y juvenil y adulto (n=5).

La topografía celular se diferenció con la técnica de tinción H-E (Wilson y Gamble, 2002) modificada con cloruro de litio concentrado para acelerar y mejorar la coloración del citoplasma. Se analizaron las etapas Zoea 3, Mysis 1 a 3, PL1-2, PL4, PL7-8, PL12, PL15, PL22, PL39, juvenil y adulto (n=5). La PL39, los juveniles y adultos fueron disectados para analizar sólo la región anterior del cuerpo. En adulto no se logró obtener muestra de Br para la técnica H-E. La disección no fue necesaria en larvas ni en el resto de PL's.

Las muestras siguieron el proceso clásico de deshidratación alcohol-benceno para crustáceos (ver anexos - Protocolo1). Las piezas se embebieron en Paraplast (Kendall) y se realizaron cortes histológicos transversales y longitudinales a 4 µm en un microtomo Leitz RM2125RT. Los cortes se colectaron cuidadosamente en un baño de albúmina y se secaron durante dos días a temperatura ambiente. Después se contrastaron con la técnica H-E (ver anexos - Protocolo2).

Las laminillas fueron analizadas y seleccionadas en un microscopio óptico con objetivos 5, 10, 20, 40, 63 y 126X (Zeiss AXIOSKOP 40; Carl Zeiss). Se evaluó la forma celular y la organización del epitelio G, E, Br, y en la Pl.

En ambos tipos de microscopía se obtuvieron fotografías con una cámara digital Carl Zeiss con el programa AXIOVISION® para Windows XP. Todas las imágenes fueron editadas para eliminar el fondo con los programas Adobe PhotoShop CS6 13.0 x64 e ImageJ 10.2, ambos para MAC OS X (San Diego, California USA). Para ilustrar el desarrollo de las branquias con un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) en las poslarvas iniciales (PL1-PL4) y PL22, las muestras previamente fijadas en glutaraldehído 4% se enviaron a procesar y fotografiar en el IPICyT.

8.2.2. Localización de la NKA en la cámara branquial mediante IFI

Se localizó la NKA en el epitelio de la cámara branquial de *L. vannamei* en distintas etapas: Zoea 3, Mysis1-3, PL1-2, PL4, PL15, juvenil y adulto (n=3). Las muestras siguieron el proceso clásico de deshidratación gradual en etanol-benceno para crustáceos (ver anexos - Protocolo1) y se embebieron en Paraplast (Kendall). Se realizaron cortes histológicos seriados (A y B) de 4 µm en un microtomo Leitz RM2125RT. La serie A se utilizó para la localización celular de la NKA en el epitelio de la cámara branquial (ver anexos – Protocolo 4), y la serie B para la tinción H-E. Los cortes fueron colectados cuidadosamente en laminillas cubiertas con poli-L-lisina al 0.1% (serie A; ver anexo - protocolo3) y en un baño de albúmina (serie B). Las laminillas para la IFI se secaron durante 2 días a 37 °C y se archivaron varios meses hasta su marcaje.

El anticuerpo primario (ACI) utilizado fue el anticuerpo comercial monoclonal IgG hecho en ratón dirigido a la cadena $\alpha 5$ de la NKA del pollo *Gallus gallus* (Fambrough, D.; Universidad de Iowa). El anticuerpo secundario (ACII) fue un anti-IgG de ratón expresado en chivo (ACII); este ACII está unido al fluorocromo FITC (5'-isotiocianato de fluoresceína) que flúorese a una longitud de onda de 488 nm (Johnson & Inmuno). Ambos anticuerpos se utilizaron a la concentración de 10 mg/uL. La IFI se realizó en dos laminillas (negativo, positivo) que se protegieron con un cubreobjetos y resina especial para IFI (Fluoromount; Sigma). La laminilla negativa no incluye el ACI.

Las laminillas fueron observadas con un microscopio de epifluorescencia Zeiss a 488 nm de longitud de onda y una apertura de fluorescencia de 1.6 s y objetivo de 20x. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Carl Zeiss adaptada al microscopio y observadas en el programa ImageJ 10.2 para MAC OS X (San Diego, California USA).

8.2.3. Localización de ionocitos mediante MET

Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 4% con una osmolalidad similar a la obtenida en la hemolinfa de los camarones a las 12h (ver medición de osmolalidad; § 7.2.2). La fijación en glutaraldehído duró 12h y posteriormente se preservaron en glutaraldehído 1% durante dos años.

El proceso continuó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), en donde las muestras previamente preservadas en glutaraldehído 1% fueron lavadas y postfijadas con una solución de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% previamente ajustado con cacodilato de sodio durante 1 hora en hielo. Los tejidos fueron lavados y deshidratados con una serie gradual de etanol absoluto. Las muestras fueron embebidas en resina LR White (Ted Pella, Inc.) y fueron polimerizadas durante dos días con luz UV. Las zonas de interés se ubicaron mediante cortes semifinos (0.5-1 μm) teñidos con azul de toluidina al 1%. Los cortes ultrafinos (60-90 nm) se realizaron con una navaja de diamante en un ultramicrotomo (Sorvall MT2) y fueron montados sobre rejillas de cobre cubiertas con formvar y contrastados con acetato de uranilo al 4% y citrato de plomo al 2%.

Las observaciones se realizaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 200CX a 100 kV, facilitado por el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología del IPICYT. Sólo fue posible el análisis en el Br y E de PL1; en el Br de Mysis 2 y PL15; en el E del adulto; y en la G de PL15, juvenil y adulto.

8.3. Resultados

8.3.1. Formula branquial

En Mysis 1 el complejo G-E estuvo ausente visualmente y sólo se observaron los Br, los cuales corresponden a lo que comúnmente se conoce como cefalotórax (Fig. 14). A partir de PL1 se observaron entre 9 y 10 estructuras con forma tubular en la cámara branquial (CB) (Fig. 15a). Entre PL4 y PL7 se observaron 11 de estas estructuras, y hacia la región más anterior se distinguió claramente el primer E (Fig. 15b). Las 11 estructuras observadas corresponden a los ejes primarios de las primeras branquias (Art).

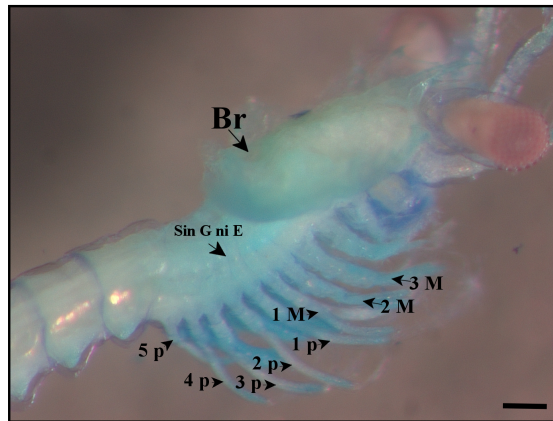


Figura 14. Vista lateral de Mysis 1 de *L. vannamei*. Se observa una cámara branquial con ausencia de branquias y epipoditos. Se indican los pereopodos del uno al cinco y los maxilípedos del uno al tres. Br, branquiostegito; E, epipodito; G, branquias; M, maxilípedo; p, pereopodo. Barra, 100 μ m.

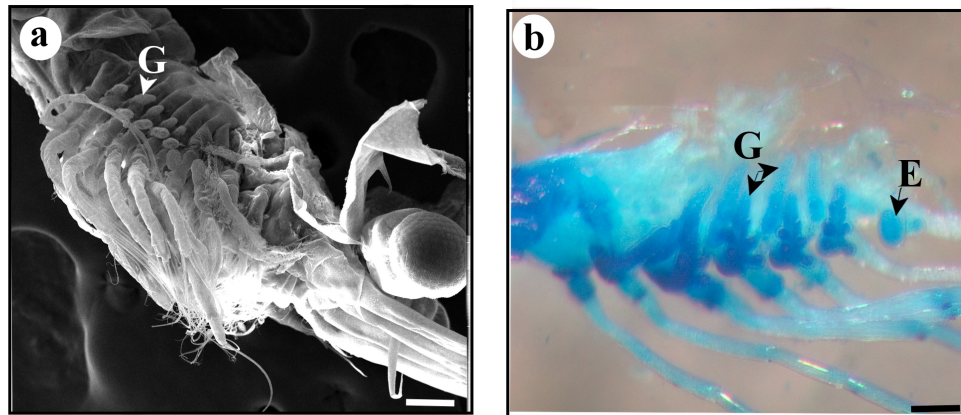


Figura 15. Vista lateral de PL1 y PL4 de *L. vannamei*. a, se observan las primeras branquias en la cámara branquial de PL1. b, se observan el primer epipodito y las ramificaciones de las branquias en PL4. G, branquias; E, epipodito. PL1, poslarva 1; PL4, poslarva 4. Barra, 100 μ m.

En etapas posteriores (>PL10) fueron visibles las pleurobranquias, las cuales se ubican sobre la Pl y están por detrás de las artrobranquias. En estas etapas se observaron entre 17 y 18 G. En PL10 y PL11 se observó variación en el número de E. Si bien el primer E siempre estuvo presente, el grado de desarrollo de los otros cuatro varió y las PLs presentaron las siguientes características: con todos los E desarrollados (Fig. 16a); con la ausencia del segundo E; y, con primordios de los E del 2 al 5 (Fig. 16b). En estas etapas poslarvales todas las artrobranquias presentaron la primer ramificación, mientras que las pleurobranquias estaban poco ramificadas o sin ramificar.

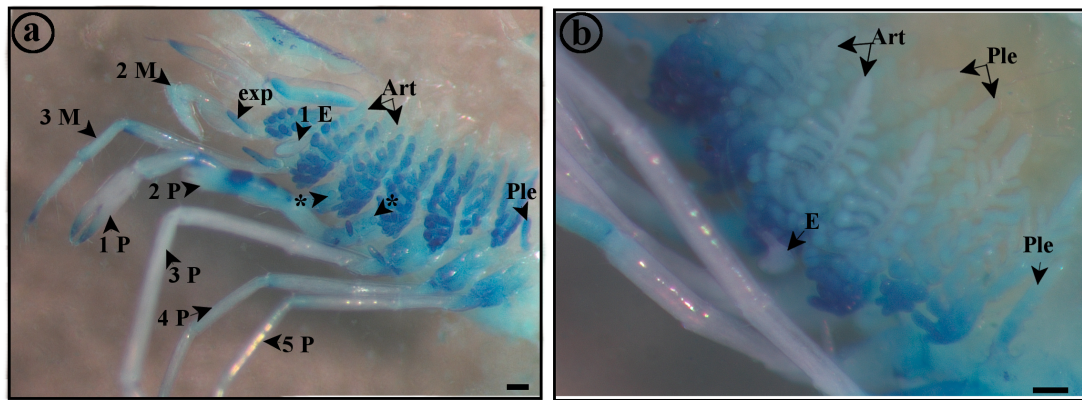


Figura 16. Vista lateral de la cámara branquial de *L. vannamei* a la edad de PL10. a, PL10 con el primer epipodito desarrollado y las gemas (*) de los otros epipoditos. b, PL10 con todos los epipoditos desarrollados, se indica un epipodito. Art, artrobranquias; E, epipodito; exp, exopodito; G, branquias. M, maxilípedos (2° y 3°); P, pereiópodos (1- 5); Ple, pleurobranquias. Barra, 100 μ m.

La fórmula branquial final de *L. vannamei* es de 18 G (11 artrobranquias, 7 pleurobranquias) y 5 E. Esta fórmula branquial se estableció en PL15; no obstante, la ramificación terciaria o lamelar se observó en algunas G a partir de PL22 (Fig. 17a y b). Las branquias de PL22, PL39, juvenil y adulto presentaron la forma típica de la branquia dendobranquia, la cual se caracteriza por presentar un eje central con ramificaciones secundarias curvadas y con puntas dispuestas una hacia la otra; a partir de los ejes secundarios se ramifican muchas lamelas que a su vez se ramifican por lo menos una vez (Martin *et al.*, 2007). En la figura 18 se observan el E en desarrollo de una PL10 y el E en forma de Y de un adulto (Fig. 18). Las G y los E estuvieron ubicados en cada CB en el 2° y 3er apéndice maxilar y en los pereiópodos del uno al cinco. No hay E asociados a los pereiópodos 4 y 5 (4 P y 5 P).

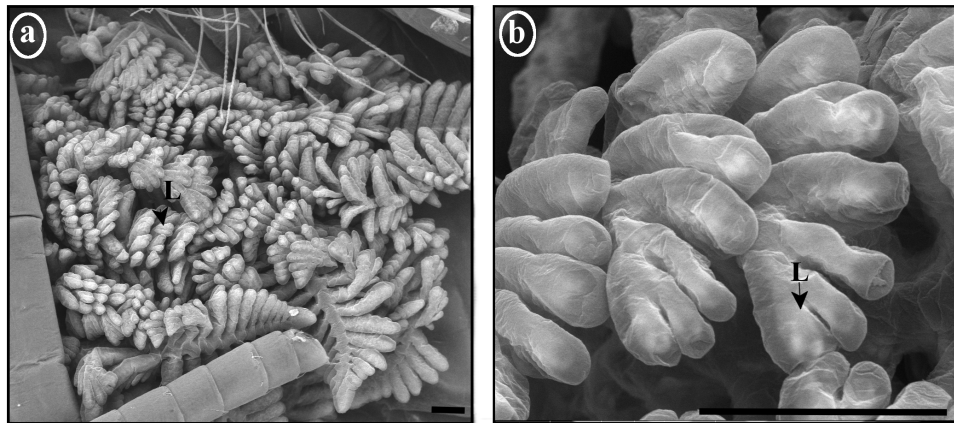


Figura 17. Branquias de *L. vannamei* a la edad de PL22. a, se observan todas las branquias (18; 11 artrobranquias y 7 pleurobranquias) ramificadas y en algunas se observa la ramificación terciaria o lamelas (*). b, lamelas. L, lamelas. Escala, 100 μ m.

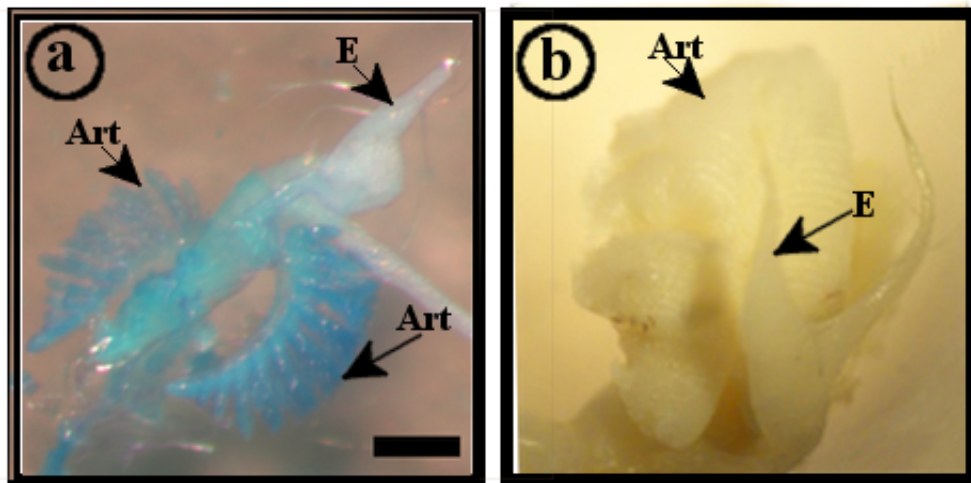


Figura 18. Epipoditos de PL10 y adulto de *L. vannamei*. a, PL10 y b, adulto. Art. artrobranquia; E, epipodito. Escala, 200 μ m (a).

8.3.2. Topografía celular y ultraestructura de ionocitos de la cámara branquial

Etapas larvales

La topografía celular de las estructuras de la CB fue posible observarla desde la etapa Zoea 3. La figura 19 corresponde a un corte transversal de Zoea 3 donde se observan los dos Br y las Pl. Los camarones tienen dos Br y Pl, uno a cada lado del camarón. Los Br inician en la parte dorsal y progresivamente crecen hacia la región

ventral para formar la CB. El Br es una estructura que posee cutícula tanto en la parte interna como externa. En estas etapas está formado por dos capas de epitelio delgado separados por un espacio hemolinfático.

La Pl está formada por una capa de epitelio cúbico alineado perfectamente a ambos lados del cuerpo del camarón y posee cutícula hacia el lado externo (Fig. 19). En la región más basal de la Pl de Mysis 1 se observó un grupo de células más pequeñas y desordenadas (Fig. 20a) que en Mysis 2 formaron los primordios de las G constituidas por un epitelio de células delgadas (Fig. 20b).

En la figura 20c se observa el Br de Mysis 2 mediante MET. En la estructura se observaron claramente las dos capas epiteliales, y una cutícula más gruesa en la parte externa y una cutícula más delgada en la parte interna de la estructura. La célula que forma ambos epitelios se caracterizó por poseer núcleos grandes y pocos organelos, sin las microvellosidades o la invaginación basal que son características de los ionocitos (Taylor y Taylor, 1992) (Fig. 20c); aparentemente en esta etapa y en esta salinidad (32 UPS) esta estructura no está relacionada con el transporte iónico.

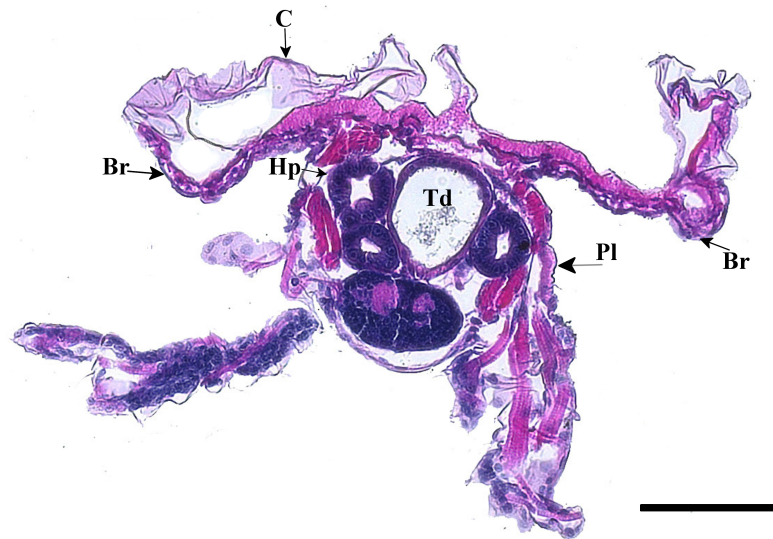


Figura 19. Corte transversal de la región del cefalotórax de Zoea 3 de *L. vannamei*. Se indica la cámara branquial que se forma por la Pleura y el Branquiostegito. Br, branquiostegito; C, cutícula; Hp, hepatopáncreas; Pl, pleura; Td, tubo digestivo. Tinción H - E. 20x. Barra, 100 μ m.

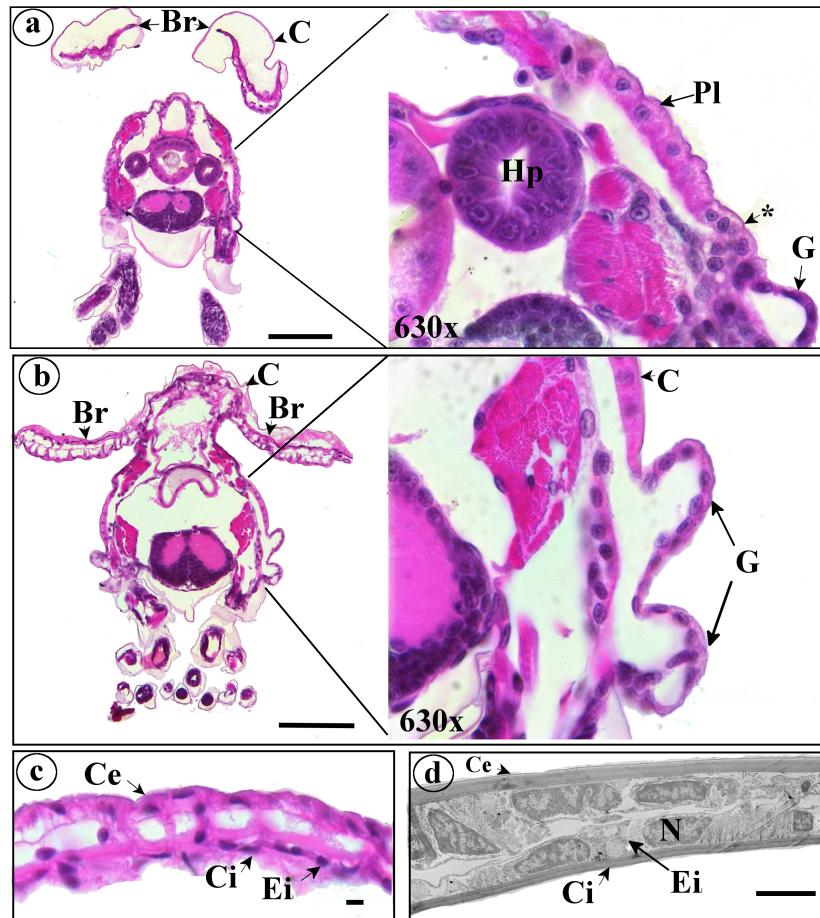


Figura 20. Topografía celular de un corte transversal en la región del cefalotórax de Mysis 1 y Mysis 2 de *L. vannamei*. a, M1; se indican la pleura y por debajo las células diferenciadas que formaran los primordios de las branquias; b, M2; se indican los branquiostegitos, la pleura y los primordios de las branquias en una cámara branquial. c, ultraestructura celular del branquiostegito de M2. Br, branquiostegito; C, cutícula; Ce, cutícula externa; Ci, cutícula interna; G, branquias; Hp, hepatopáncreas; Pl, pleura; N, núcleo. Tinción H - E. Barra, 100 μm (a y b); 5 μm (c y e).

Etapas PL1 – PL12

En las etapas poslarvales de entre PL1 y PL12 se observó que la estructura más anterior de la CB corresponde al primer E (Fig. 21a). Esta estructura está formada por dos capas de epitelio cúbico bordeados por cutícula y separados por un espacio hemolinfático (Fig. 21b). En estas etapas el epitelio que conforma la Pl cambió a partir de PL1 y sólo se distinguió una capa de epitelio plano El epitelio del Br fue más distinguible en estas etapas del desarrollo y la célula es ligeramente cúbica; fue evidente la presencia de una célula con el núcleo orientado transversalmente (Fig. 21c) la cual

pudiese ser la célula pilar reportada por Taylor y Taylor (1992) para darle soporte al Br. Contrario a los epitelios observados en los Br y E, el epitelio observado en las G fue del tipo plano. En la figura 21d se observa el séptum que divide a estas estructuras en su eje longitudinal.

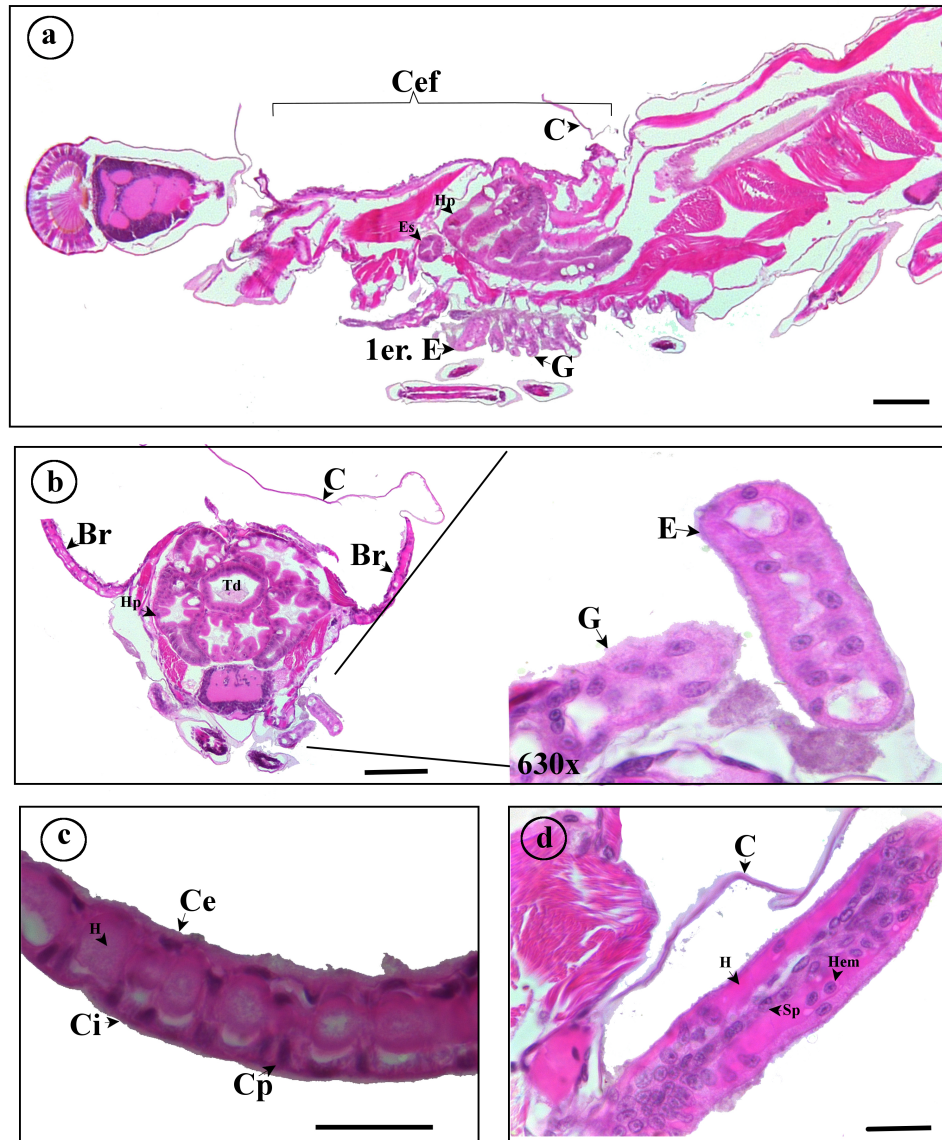


Figura 21. Topografía celular de PL1 y PL4 de *L. vannamei*. a, corte longitudinal de PL4 donde se indica el primer epipodito y las branquias; b, corte transversal de la región del cefalotórax de PL1, se indican la ubicación de los branquiestegitos, un epipodito y una branquia; c, branquiestegito de PL1 donde se observa la célula pilar; d, branquias sin ramificar de PL4. Br, branquiestegito; C, cutícula; Ce, cutícula externa; Ci, cutícula interna; Cp, célula pilar; Es, estómago; H, hemolinfa; Hem, hemocitos en circulación; Hp, hepatopáncreas; Sp, séptum primario. Tinción H - E. Barra, 100 μ m (a y b), 20 μ m (c y d).

En la figura 22 se observan el Br y E de PL1 mediante MET. En el Br se distinguió la cutícula gruesa del lado externo y la cutícula delgada de lado interno (Fig. 22a). Tanto la célula cúbica (Fig. 22b y c) como la célula pilar (Fig. 22a) tienen invaginaciones basales asociadas a mitocondrias grandes que ocupan gran parte del citoplasma celular. De su lado apical son evidentes las microvellosidades asociadas a mitocondrias (Fig. 22c). Las células cúbicas que forman al E de PL1 (Fig. 22d y e) presentaron características ultraestructurales (Fig. 22e) similares a la célula cúbica del Br. Este diseño está descrito para los ionocitos (Taylor y Taylor, 1992), lo que sugiere que las estructuras formadas por células cúbicas en las poslarvas iniciales y la célula pilar tienen una función en el transporte iónico.

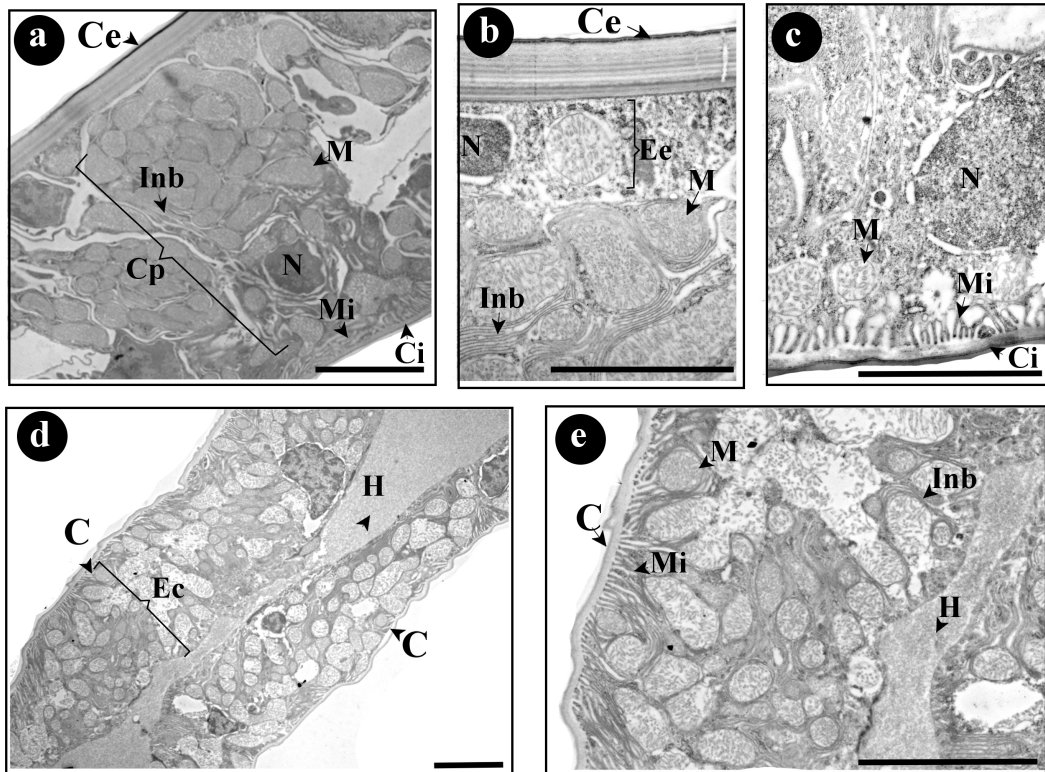


Figura 22. Ultraestructura celular del branquiostegito y epipodito de PL1 de *L. vannamei*. a, branquiostegito donde se indica la célula pilar; b, región basal de la célula cúbica del branquiostegito, se indica el epitelio externo; c, región apical de la célula cúbica del branquiostegito; d, epitelio cúbico del epipodito; e, célula cúbica del epipodito. Br, branquiostegito; Ci, cutícula interna; Ce, cutícula externa; Cp, célula pilar; Ec, epitelio cúbico; Ee, epitelio externo; H, hemolinfa; Inb, invaginación basal; M, mitocondrias; Mi, microvellosidad; N, núcleo. PL1, poslarva 1. Barra, 5 μ m.

Etapas PL15-Adulto

La topografía celular de los epitelios de PL15 y hasta adulto fue similar (Fig. 23). Desde PL15 el epitelio del Br estuvo bien diferenciado en dos tipos. De lado externo se observaron células cúbicas asociadas a una cutícula gruesa y de lado interno las células cúbicas observadas en las etapas anteriores se modificaron a células prismáticas asociadas a una cutícula delgada (Fig. 23a, b y c). En estas etapas no se observó la célula pilar descrita en el Br de larvas y poslarvas más pequeñas. Pero en algunas regiones tanto del Br como del E se observó que las células se unen para formar una especie de columna posiblemente para darle soporte a la estructura. En algunas regiones del lado interno del Br (principalmente en PL15) se observaron células un poco más bajas (cúbicas) debido a la existencia de vasos hemolinfáticos (Fig. 23).

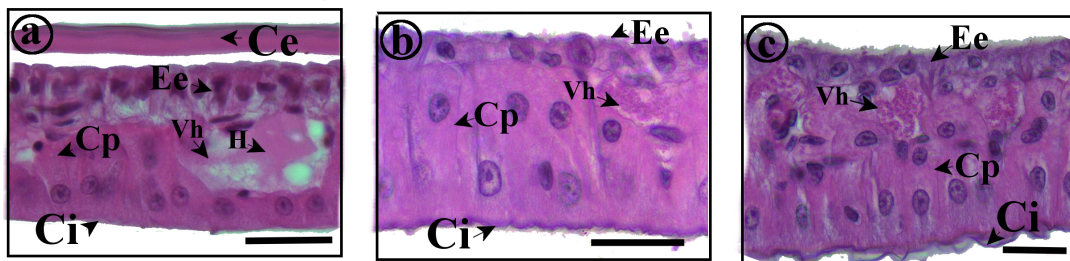


Figura 23. Topografía celular comparada de los branquiostegitos de *L. vannamei*. a, PL15; b, PL39 y c, juvenil. En todas las etapas se observan dos capas epiteliales, la más externa formada de epitelio cúbico y la interna formada de epitelio prismático. Ce, cutícula externa; Ci, cutícula interna; Cp, célula prismática; Ee, epitelio externo; H, hemolinfa; PL15, poslarva 15; PL39, poslarva 39; Vh, vaso hemolinfático. Tinción H - E. Barra, 20 μ m.

En la figura 24 se observa el Br de PL15 mediante MET. Se observan la capa celular de epitelio cúbico que se ubica en el lado externo de la estructura y la región basal de la célula del epitelio prismático del lado interno (Fig. 24a). Las células prismáticas del lado interno se caracterizaron por poseer una profunda invaginación basal asociada a muchas mitocondrias (Fig. 24b) así como grandes microvellosidades en el lado apical de la célula (Fig. 24c). Estas características y la forma de la célula prismática (o “thick”) concuerdan con las del típico ionocito que describen Taylor y Taylor (1992) lo que evidencia la función del Br en el transporte iónico.

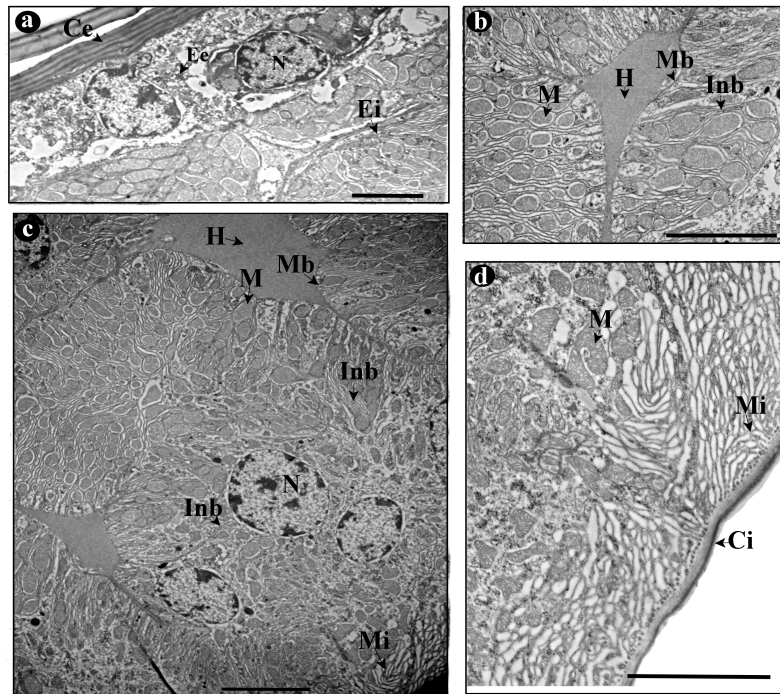


Figura 24. Ultraestructura celular del branquiostegito de PL15 de *L. vannamei*. a, epitelio externo del branquiostegito donde se observan células no diferenciadas como ionocitos; b, región basal del epitelio interno donde se observa la membrana basal del ionocito; c, epitelio interno del branquiostegito con células diferenciadas como ionocitos; d, parte apical del ionocito donde se observan las microvellosidades. Ci, cutícula interna; Ce, cutícula externa; Ee, epitelio externo; Ei, epitelio interno; Inb, invaginación basal; M, mitocondrias; Mb, membrana basal; N, núcleo. PL15, poslarva 15. Barra, 5 μ m.

En la figura 25 se observan los E de PL15, 39, juvenil y adulto. En estas etapas del desarrollo los E estuvieron formados por dos capas epiteliales iguales de células prismáticas bordeadas por cutícula y separadas por un espacio hemolinfático, aunque un poco menos evidente que el observado en las poslarvas iniciales. En juveniles y adultos se observaron fibras de tejido conjuntivo que forman parte de la matriz celular y le dan soporte a la estructura (Fig. 25c y d).

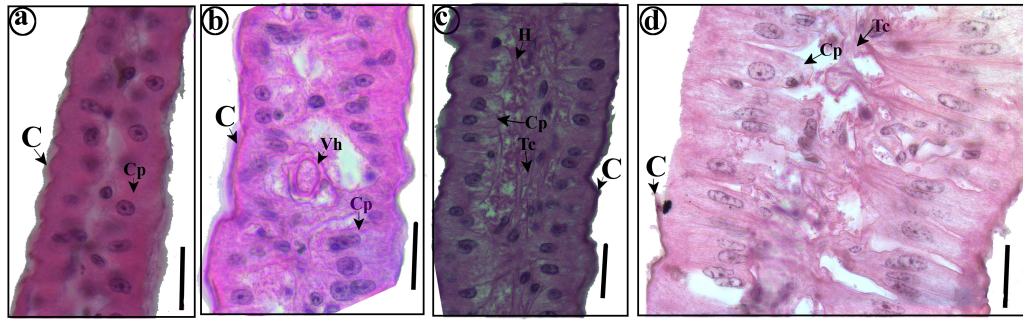


Figura 25. Topografía celular comparada de los epipoditos de a) PL15, b) PL39, c) Juvenil y d) Adulto de *L. vannamei*. En todas las etapas se observan dos capas epiteliales iguales de células prismáticas separadas por un espacio hemolinfático. C, cutícula; Cp, célula prismática; PL15, poslarva 15; PL39, poslarva 39; Tc, tejido conjuntivo; Vh, vaso hemolinfático. Tinción H – E. 630x. Barra, 20 μ m.

La célula prismática del E del adulto presentó características de ionocito (Fig. 26); la membrana basolateral está muy desarrollada y casi alcanza el lado apical de la célula, donde la membrana a diferencia del Br de PL15 tiene apariencia de invaginaciones basales (Fig. 26c) similares a las reportadas en los ionocitos del E de *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994). De estas observaciones resulta evidente que esta estructura al igual que el Br tiene una función en el transporte iónico.

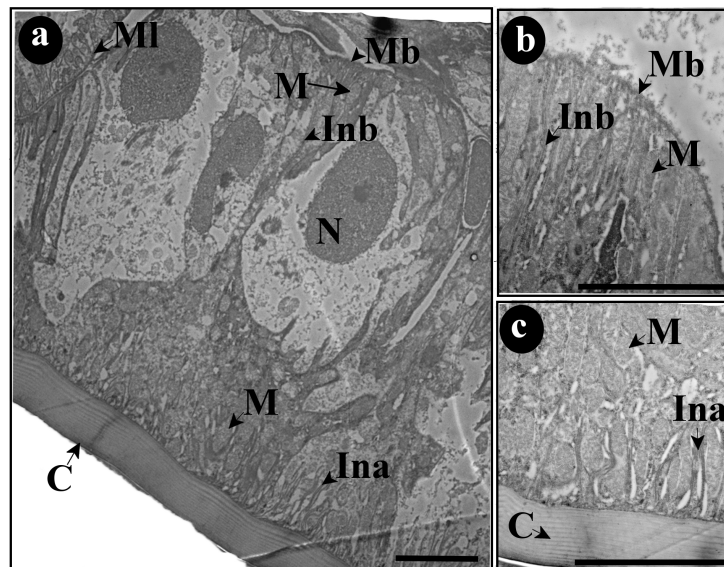


Figura 26. Ultraestructura celular del epipodito del adulto de *L. vannamei*. a, células prismáticas diferenciadas como ionocitos; b, región basal de la célula donde se observan las invaginaciones asociadas a mitocondrias; c, región apical de la célula donde se observan las invaginaciones apicales asociadas con mitocondrias. C, cutícula; E, epipodito; Ina, invaginación apical; Inb, invaginación basal; M, mitocondrias; Mb, membrana basal; MI, membrana lateral; N, núcleo. Barra, 5 μ m.

Las G en las etapas poslarvales PL15, PL39, en juvenil y adulto estuvieron protegidas por cutícula y formadas por un epitelio simple de células planas y en algunas partes se constató que hay una célula tipo “pestaña”. Esta célula se caracteriza por tener el núcleo asociado al séptum y poseer extensiones citoplasmáticas muy alargadas que se unen para formar las lacunas hemolinfáticas (LH) que sirven para incrementar la circulación de la hemolinfa (Taylor y Taylor, 1992). En la figura 27a-d se observan las LH de las etapas PL15, 39, juvenil y adulto. Las ramas primarias, secundarias e incluso las ramificaciones terciarias de las G estuvieron divididas por un séptum interior perpendicular a lo largo de la estructura. Esta división forma los vasos aferentes y eferentes por donde circula la hemolinfa oxigenada y desoxigenada, respectivamente (Taylor y Taylor, 1992). En los cortes transversales de las G fue evidente que por debajo de la cutícula sólo hay epitelio simple y plano (Fig. 27e, f).

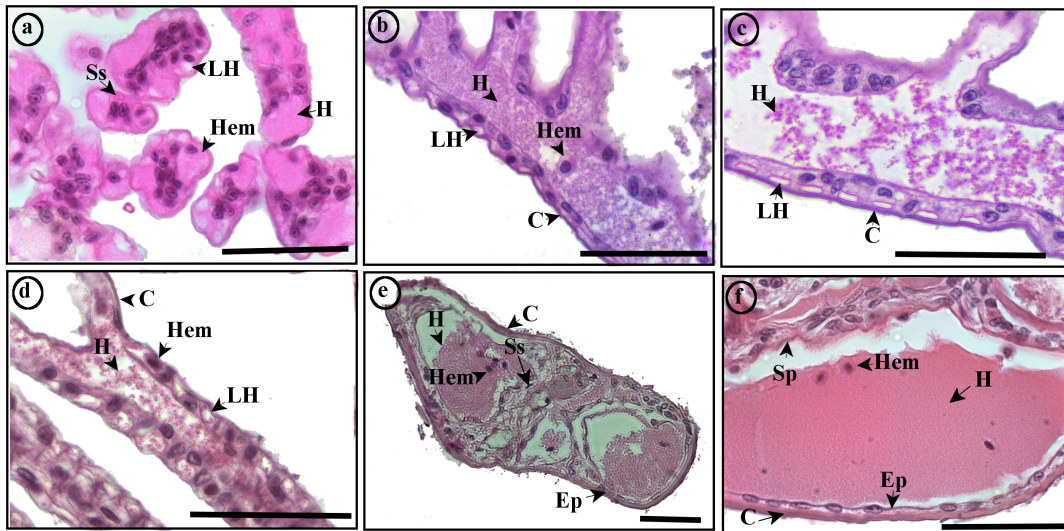


Figura 27. Topografía celular comparada de las branquias de a) PL15, b) PL39, c) juvenil y d) adulto de *L. vannamei*. a, cortes transversales de la ramificación secundaria de PL15, se indican las lacunas hemolinfáticas; b, corte longitudinal del eje central de PL39, se indican las lacunas hemolinfáticas y hemocitos en circulación; c, corte longitudinal del eje primario de juvenil, se indican las lacunas hemolinfáticas; d, corte longitudinal de una ramificación secundaria del adulto, se indican las lacunas hemolinfáticas. e y f, corte transversal del eje secundario del juvenil (e) y primario del adulto (f) donde se observa el epitelio plano. C, cutícula; Ep, epitelio; H, hemolinfa; Hem, hemocitos en circulación; LH, lacunas hemolinfáticas; Ss, séptum secundario, Sp, séptum primario. Barra, 50 µm.

En las observaciones que se realizaron mediante MET (Fig. 28 a-d), el epitelio de las G fue similar al observado mediante H-E; un epitelio plano formado por células con

poca diferenciación de organelos, en algunas de las cuales se observaron mitocondrias. Este tipo celular ha sido descrito por Taylor y Taylor (1992) para el transporte de gases, por lo que muy probablemente esta sea su principal función.

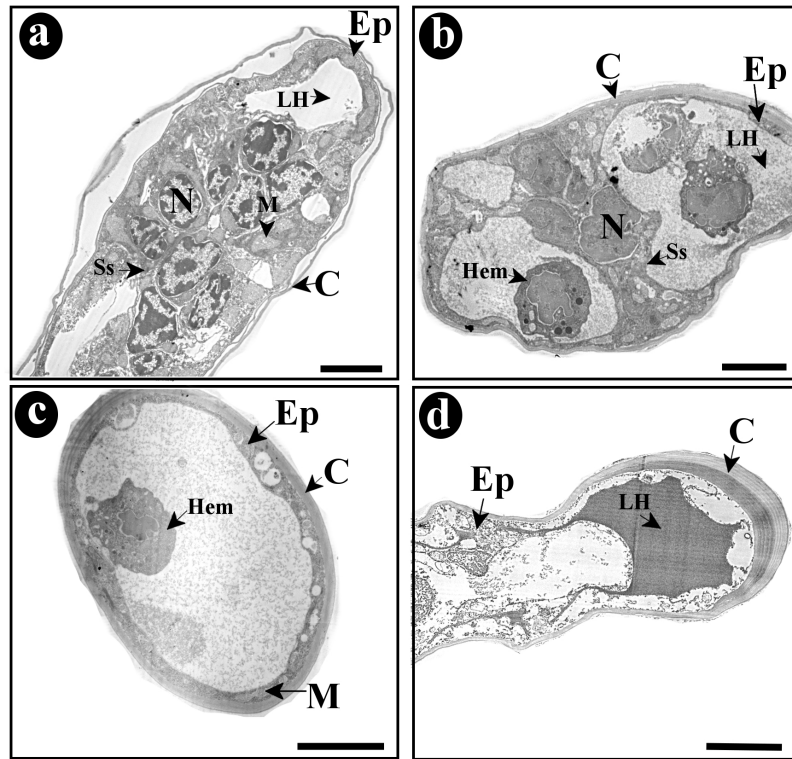


Figura 28. Ultraestructura celular de las branquias de *L. vannamei* en a) PL15, b y c) juvenil, d, adulto. a, corte transversal del séptum secundario de PL15; b, corte transversal del séptum secundario del juvenil, se indica un hemocito en circulación; c, corte transversal de una lamela de juvenil, se indica un hemocito en circulación; d, corte longitudinal de una lamela de adulto. En a, b, c y d se observa el epitelio plano que forma a la estructura. C, cutícula; Ep, epitelio; H, hemolinfa; Hem, hemocito en circulación; LH, lacuna hemolinfática; M, mitocondrias; N, núcleo. Ss, séptum secundario. μm .

8.3.3. Localización de la ATPasa Na^+/K^+ en la cámara branquial (IIF)

Con base en los resultados de IFI no se detectó NKA en las etapas larvales (Zoea 3, Mysis 1-2), en PL1 y en PL4 (imágenes no presentadas). Sólo se observó inmunomarcaje positivo en las células prismáticas del epitelio interno del Br y en ambas capas epiteliales del E en las etapas PL15, juvenil y adulto (Tabla 3, Fig. 29). El control negativo resultó sin fluorescencia (Fig. 29). En ninguna de estas últimas etapas se observó inmunomarcaje positivo en las G (Fig. 29), lo que posiblemente se deba a que

estas estructuras están formadas principalmente por células planas no diferenciadas como ionocito (Fig. 28). Lo cual es característico de las estructuras que tienen como principal función la respiración (Taylor y Taylor, 1992).

Tabla 3. Resumen de la localización de la α -NKA mediante IIF en estructuras de la cámara branquial de diversas etapas del desarrollo de *L. vannamei*. El signo (-) significa ausencia de inmunomarcaje y el signo (+) inmunomarcaje positivo. Z3, Zoea 3; M2, Mysis 2; M3, Mysis 3; PL1, poslarva 1; PL4, poslarva 4; PL15, poslarva 15; J, juvenil; A, adulto. Pl, pleura; G, branquias; Br, branquiostegito; E, epipodito. nd, no determinado. El recuadro negro indica que la estructura no está desarrollada.

Estructura	Etapa del desarrollo						
	Z3	M2 y M3	PL1	PL4	PL15	J	A
Pl	-	-	-	-	-	-	-
G			-	-	-	-	-
Br	-	-	-	-	+	+	nd
E			-	-	+	+	+

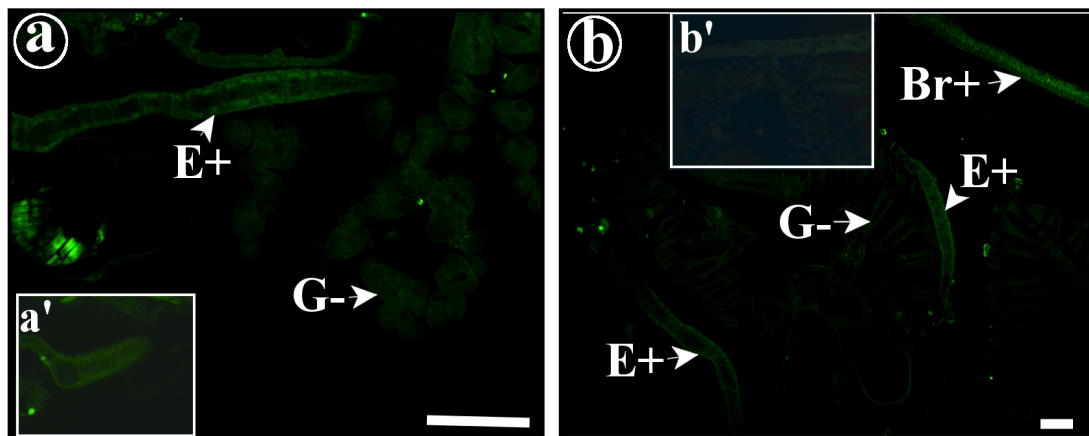


Figura 29. Localización celular de la α -NKA en a) PL15 y b) juvenil de *L. vannamei*. Se indican las estructuras inmunopositivas a la NKA con un símbolo +. a' y b' corresponden a los controles negativos. Br, branquiostegito; E, epipodito. G, branquias. Barra, 100 μ m.

La NKA se localizó en las dos capas epiteliales de células prismáticas a lo largo del E y en la capa epitelial de células prismáticas de lado interno del Br. En la figura 30 se observa que la distribución celular de la NKA en el E fue más evidente en la región lateral, mientras que en el Br se observó muy delimitado en la región basal de la célula

(Fig. 30). La ubicación de la proteína en estas regiones de la célula concuerda con la ubicación basolateral propuesta en las células que funcionan como ionocitos en otras especies (Cieluch *et al.*, 2005; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2014).

Las células que fueron inmunoreactivas a la NKA también presentaron características ultraestructurales típicas de ionocito (Fig. 24 y 26). Sin embargo esta correlación no se observó en las etapas poslarvales iniciales. La falta de inmunomarcaje de la NKA en las etapas PL1 o PL4 pudo deberse a una baja expresión de la proteína, ya que se demostró por MET en la etapa PL1 que al menos el Br y el E sí están formados por un epitelio con células con características de ionocitos (Fig. 22). En contraste, la falta de inmunomarcaje positivo en las etapas larvales se debió a que las células aún no están desarrolladas como ionocitos, esto se observó mediante MET en el Br de Mysis 2, en esta etapa las células que forman el epitelio de la estructura no presentan ninguna característica típica en su ultraestructura (Fig. 20c).

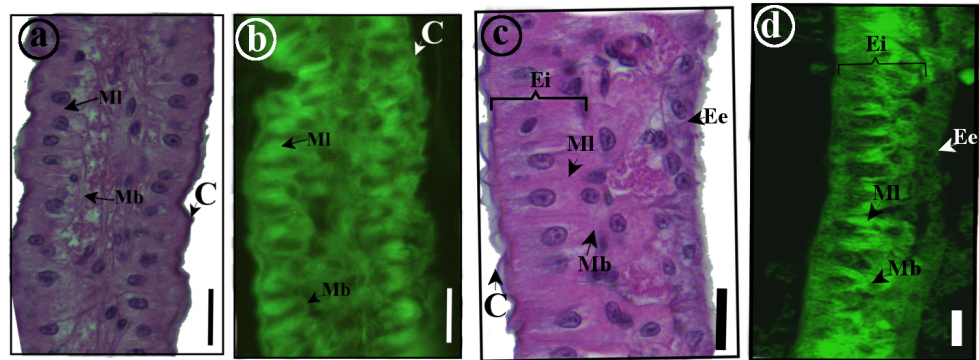


Figura 30. Comparación de la topografía celular y la localización de la NKA en el epipodito (a y b) y el branquiostegito (c y d) del juvenil de *L. vannamei*. b y d, se observa la localización basolateral de la NKA. Br, branquiostegito; C, cutícula; E, epipodito; Ee, epitelio externo; Ei, epitelio interno; Mb, membrana basal; MI, membrana lateral. Tinción H – E (a y c); IFI (b y d). Barra, 20 μ m.

8.4. Discusión

Las estructuras de la cámara branquial de *L. vannamei* se desarrollaron progresivamente al igual que los epitelios que las forman y diferencian. El desarrollo completo de la cámara branquial es un proceso que inició muy temprano en el desarrollo (con la presencia de branquiostegito en Zoea 1) y se extendió hasta etapas poslarvales avanzadas (PL15-PL22). El inicio de las branquias ocurrió en las etapas de Mysis similar a lo reportado para el camarón *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994). En *L.*

vannamei se observó un 1er epipodito en PL1 (Fig. 21b) por lo que es posible que esta estructura se desarrolla también en las últimas etapas larvales entre Mysis 2 y 3 como sucede en *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994). Sin embargo, en esta última especie los epipoditos se retienen como gemas hasta PL5, mientras que en *L. vannamei* el epipodito es claramente visible como una estructura tubular desde PL1. La presencia de epipoditos como estructuras desarrolladas y no como gemas, se observa también en los resultados que presenta Pham *et al.* (2012a) para la PL2 de *L. stylirrostris*.

L. vannamei tiene la típica branquia dendobranquia reportada para los Peneidos (Taylor y Taylor, 1992; Martin *et al.*, 2007) y se observó a partir de PL22. La fórmula branquial es una característica de los diferentes grupos de decápodos (Taylor y Taylor, 1992). *L. vannamei* en una cámara branquial tiene el mismo número y tipo de branquias (18) que *P. japonicus*, pero difieren en el número de epipoditos (5 en lugar de 6) y en la ubicación de una branquia. En *L. vannamei* no hay ninguna branquia por debajo de las artrobranquias, en la coxa de los pleópodos, por lo tanto no hay podobranquia como se reporta para *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994). Estas diferencias posiblemente están asociadas a diferencias evolutivas, lo que en parte los agrupa en diferentes géneros (*Penaeus* vs *Litopenaeus*) (De Grave *et al.*, 2009).

En *L. vannamei* se detectó variabilidad individual en el desarrollo de las branquias (ramificaciones) y en particular en el número de epipoditos en las poslarvas (PL11-12). Se constató que hay variabilidad en el desarrollo de los últimos cuatro epipoditos; hay poslarvas de la misma edad con y sin las estructuras. Esta variabilidad no se observó en PL15 ni en juvenil o adulto; todas presentaron la fórmula branquial final de 18 branquias y 5 epipoditos bien desarrollados. Esto sugiere que existe variabilidad en el tiempo individual en que se desarrollan las estructuras en las poslarvas con la misma edad cronológica. Algo similar se ha reportado en dos poblaciones del langostino *M. amazonicum* pero con respecto al desarrollo de las branquias. En la misma etapa del desarrollo (Zoea V) las branquias están más desarrolladas en la población de la región del Pantanal que en la población del estuario Amazónico; sin embargo, en etapas más avanzadas (decapoditos) las branquias están igual de desarrolladas en ambas poblaciones (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013).

En este estudio los individuos que se analizaron provienen de una sola población, por lo que muy probablemente las diferencias en el desarrollo de las estructuras se deban a un crecimiento desigual por una mayor competencia por el espacio, alimento o por condiciones de estrés; variables que afectan el crecimiento en los estanques de cultivo. En particular, el éxito en la alimentación es indispensable para que se efectúe el crecimiento somático del organismo (Martínez-Porchas *et al.*, 2009). Asimismo la distribución de los recursos energéticos puede variar durante el desarrollo; las larvas tanto de crustáceos como de peces destinan una mayor cantidad de recursos energéticos al desarrollo de órganos asociados al consumo de alimento y locomoción con el objetivo de incrementar las probabilidades de supervivencia (Osse *et al.*, 1997). En *L. vannamei* el desarrollo de la cámara branquial ocurre simultáneamente con el desarrollo del sistema reproductor, por lo que es probable que en el desarrollo poslarval de *L. vannamei* la inversión de energía estaría destinada al crecimiento somático para desarrollar primero los órganos sexuales, lo cual ocurre a partir de PL12 (Garza-Torres *et al.*, 2009); y posteriormente o cuando hay suficiente energía disponible se desarrollarían los últimos cuatro epipoditos. Esto implica que el papel de los cinco epipoditos en la salinidad de cultivo (32-34 UPS) pudiese no ser determinante para la supervivencia de las poslarvas.

A este respecto, el número de branquias entre los camarones *Palaeomon adspersus* y *Rimicaris exoculata* varían de ocho a 10 pares, respectivamente; y aunque tienen el mismo número de epipoditos (tres), estos están más desarrollados en *P. adspersus*. Tanto las branquias como los epipoditos son adaptaciones importantes según el hábitat de las especies. *P. adspersus* es una especie epibentónica que vive en lagunas costeras de salinidad variable, mientras que *R. exoculata* vive en ventilas hidrotermales profundas donde la baja disponibilidad de oxígeno conlleva a la necesidad de tener más branquias y menos epipoditos o epitelio osmorregulador (Martínez *et al.*, 2005).

El desarrollo de las estructuras de la cámara branquial, en particular de los epipoditos, no es un tema que se considera en las investigaciones pese a que son importantes en la osmorregulación en los camarones (Bouaricha *et al.*, 1994), langostas (Haond *et al.*, 1998) y langostinos (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013). En las especies

estudiadas se da seguimiento a la función de los epitelios y en general se desconoce cuál es la dinámica del desarrollo morfológico de las estructuras después de la última metamorfosis (en etapas poslarvales), lo cual pudiese estar relacionado con el incremento de las capacidades osmorreguladoras durante el desarrollo.

Las capacidades osmorreguladoras radican en que las estructuras poseen epitelios formados por ionocitos y un mecanismo molecular (*e.g.* NKA). En el desarrollo de las estructuras de la cámara branquial de *L. vannamei* se observó un desarrollo gradual de los epitelios. En los epipoditos y el lado interno del branquiostegito la célula cambió progresivamente de célula cúbica a prismática, mientras que las células de las branquias fueron planas desde la primer poslarva, incluso en juveniles y adultos (Fig. 27).

En otras especies como los camarones *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994), *L. stylirostris* (Pham *et al.*, 2012a), *C. Crangon* (Cieluch *et al.*, 2005), en el langostino *M. amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013) y en la langosta *H. gammarus* (Lignot y Charmantier, 2001), los epitelios se especializan progresivamente y existe una transferencia de la función entre las estructuras involucradas. En *L. vannamei* sólo se observó un cambio entre la etapa de Mysis y la primer poslarva con el establecimiento de los branquiostegitos y epipoditos como estructuras osmorreguladoras, aunque falta esclarecer si la célula cúbica de la pleura (Fig. 19 y 20) posee características ultraestructurales de ionocito. Los resultados difieren a los reportados en otros camarones con estilo de vida similar, ontogenia del patrón osmorregulador y el mismo tipo de branquia dendobranquia. En *P. japonicus* mediante MET (Bouaricha *et al.*, 1994) y en *L. stylirostris* mediante IFI (Pham *et al.*, 2012a) se ha reportado que la pleura y el branquiostegito son las primeras estructuras osmorreguladoras en la etapa larval (desde Zoea), pero la pleura pierde su función en las etapas poslarvales cuando los epipoditos empiezan a ser estructuras osmorreguladoras importantes junto con los branquiostegitos.

Los resultados para *L. vannamei* sugieren que si bien las estructuras osmorreguladoras se establecen desde PL1 (por la ultraestructura celular del branquiostegito y epipodito) su mayor participación en la osmorregulación ocurre posteriormente, a partir de PL15 o en alguna etapa entre PL5 y PL14 (no analizadas en este estudio para IFI o MET). La participación activa de los ionocitos en el

comportamiento hipoosmorregulador de esta especie aparentemente es más tardía cuando se compara con *L. stylirostris*, en esta especie la NKA está presente desde la etapa Zoea en el branquiostegito y en la pleura.

El epitelio plano de las branquias observado mediante la tinción H-E (Fig. 27) sumado a la falta de inmunomarcaje para la NKA en las etapas PL15, juvenil y adulto (Fig. 29) y una ultraestructura celular poco diferenciada (Fig. 28) sugieren que las branquias tienen principalmente una función en la respiración de esta especie. Lo cual también se ha reportado para *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994), *H. gammarus* (Haond *et al.*, 1998) y en las branquias anteriores de *C. maenas* (Cieluch *et al.*, 2004).

La participación en la osmorregulación de los branquiostegitos y epipoditos en *L. vannamei* coincide con lo que se ha reportado para *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994), *L. stylirostris* (Pham *et al.*, 2012a) y *H. gammarus* (Haond *et al.*, 1998; Lignot *et al.*, 1999a). En *P. japonicus* los epipoditos son la estructura más importante dado que los branquiostegitos pierden esta función en adulto. Se desconoce lo que sucede con el branquiostegito en el adulto de *L. stylirostris* y desafortunadamente en este estudio no se tienen datos del branquiostegito que pudiesen ayudar a esclarecer si hay una pérdida en la función debido a cambios en la ultraestructura que modifiquen el comportamiento hipoosmorregulador.

8.5. Resumen del capítulo II

- ◆ Las estructuras de la cámara branquial y sus epitelios se desarrollan desde las etapas larvales hasta en animales con 15 días de crecimiento poslarval (PL15).
- ◆ La fórmula branquial final de *L. vannamei* es de 18 branquias dendobranquias (11 artrobranquias y 7 pleurobranquias) y 5 epipoditos; y está completa a la edad de PL15.
- ◆ La NKA no se localizó en ninguna de las estructuras de la cámara branquial de larvas y poslarvas iniciales, PL1 y PL4.
- ◆ La NKA se localizó en los epipoditos y en el lado interno de los branquiostegitos de las etapas PL15, juvenil y adulto.

- ◆ La célula que forma el epitelio interno del Br en M2 no presentó características de ionocito.
- ◆ La célula cúbica del epipodito y el epitelio interno del branquiostegito en PL1 presentó un tipo de ionocito sin inmunomarcaje de la NKA.
- ◆ La célula prismática que forma el epipodito de A presentó un tipo de ionocito con invaginaciones apicales y una membrana basolateral muy desarrollada asociada a mitocondrias pequeñas y la presencia de la NKA.
- ◆ La célula prismática que forma el lado interno del branquiostegito de PL15 presentó un tipo de ionocito con microvellosidades apicales y una membrana basolateral muy desarrollada asociada a mitocondrias pequeñas y la presencia de la NKA.
- ◆ Las branquias aparentemente no tienen función en el balance iónico (ausencia de ionocitos y de la NKA).

9. Capítulo III. Adaptaciones moleculares y celulares de *L. vannamei* a la variación en la salinidad ambiental.

9.1. Introducción

Las variaciones en la salinidad ambiental afectan directamente la concentración iónica de la hemolinfa (*e.g.* Na⁺ y Cl⁻) y por consiguiente al mecanismo osmorregulador. En particular, puede afectar la función de la proteína NKA. La cual es parte fundamental en la osmorregulación tanto para la absorción como para la excreción iónica activa (Péqueux, 1995). Se encarga de transportar tres iones Na⁺ del citosol a la hemolinfa a cambio de dos iones K⁺ de la hemolinfa al citosol mediante la hidrólisis del ATP (Sáez *et al.*, 2009). Por lo que su síntesis o transcripción es un elemento importante para poder hacer frente a las variaciones en la salinidad ambiental; el gen se sobreexpresa en alta o baja salinidad (Luquet *et al.*, 2005; Chung y Lin, 2006; Li *et al.*, 2015).

Por otra parte, se ha demostrado que la salinidad tiene un efecto en la ultraestructura de los ionocitos, en su tamaño, en las microvellosidades y en la membrana basolateral (Haond *et al.*, 1998; Genovese *et al.*, 2000; Lignot y Charmantier, 2001; Genovese *et al.*, 2004; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2014).

La transcripción de la NKA de los adultos de *L. vannamei* aumenta después de 6h cuando se transfieren a las salinidades bajas de entre 0.5 y 15 UPS y disminuye drásticamente a las 12h (Sun *et al.*, 2011). Cuando la transferencia es a la baja salinidad de 21 UPS, el incremento en la transcripción ocurre hasta las 12h y se mantiene en el mismo nivel durante 24h (Pan *et al.*, 2014). Se desconoce cómo se afecta la transcripción en otras etapas del desarrollo, en salinidades altas, así como el efecto de la salinidad en los ionocitos de esta especie. Por ello, en este capítulo de la tesis se describe el efecto de dos salinidades (incluyendo la salinidad control de 32 UPS) tanto en la transcripción de la NKA como en la ultraestructura de los ionocitos de etapas seleccionadas del desarrollo.

9.2. Materiales y métodos

9.2.1. Etapas del desarrollo estudiadas y diseño experimental

El efecto de la salinidad en la expresión de los transcritos de la NKA y en la ultraestructura celular de los ionocitos se evaluó a las 24h en dos experimentos separados. Los camarones se mantuvieron en recipientes de plástico adecuados a su tamaño (de entre 1 y 60 L) y bajo las condiciones experimentales establecidas (g 6.2). El efecto de la salinidad en la expresión de los transcritos se evaluó en las etapas y salinidades siguientes: Nauplio 3, Zoea 3, Mysis 2 y PL1 en 20 y 45 UPS; PL2 en 10 y 45 UPS; PL4 y juvenil en 5 y 45 UPS; adulto en 10 y 60 UPS, en todas se incluyó la salinidad control de 32 UPS. El efecto de la salinidad en la ultraestructura celular se evaluó únicamente en el Br y E de PL1 (en 20 UPS), en el Br de PL15 (en 5 UPS), en el E de juvenil (45 y 5 UPS) y en G de PL15 y juvenil (5 y 45 UPS). Los cambios en los ionocitos se contrastaron con la ultraestructura celular del ionocito en la salinidad de 32 UPS (Capítulo II).

9.2.1.1. Obtención de muestras para el análisis de la expresión de la *ATPasa Na⁺/K⁺*

Se colectaron ocho muestras de 100 mg de tejido en RNA later para cada etapa del desarrollo y salinidad. En cada etapa del desarrollo la muestra fue diferente. En adultos correspondió al tejido tanto de G como de E en una cámara branquial. En juveniles la muestra correspondió al tejido del complejo G-E de las dos cámaras branquiales de dos individuos y en PLs y larvas la muestra correspondió a un grupo de animales de cuerpo entero. Todo el proceso de la toma de muestras se realizó en hielo para evitar la degradación de las muestras, las cuales se preservaron a 4 °C hasta su análisis en el laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

9.2.1.2. Obtención de muestras para el análisis de la ultraestructura celular de ionocitos

Las muestras (grupos en larvas y PL's); G-E (3er conjunto) y Br en juveniles y adultos se fijaron en una solución de glutaraldehído al 4% con una osmolalidad similar a la obtenida en la hemolinfa de los camarones a las 12h. La fijación en glutaraldehído duró 12h y posteriormente se preservaron en glutaraldehído 1%, durante 2 años. El

proceso continuó en el IPICyT.

9.2.2. Procesado y análisis de muestras

9.2.2.1. Obtención de cDNA

Extracción de ARN y tratamiento con DNAsa

Las muestras de tejido previamente fijadas en RNA later se enjuagaron en agua ppi para eliminar el RNA later y realizar la extracción de ARN. La extracción de ARN se realizó con solución TRI (Sigma, EUA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante con algunas modificaciones (com. pers. V. Boulo; ver Anexos – Protocolo 5). Las muestras fueron manipuladas en hielo en todo momento.

Se utilizaron 50 µg por muestra de cada una de las etapas del desarrollo evaluadas. En larvas y PLs correspondió a un grupo de organismos; en juveniles y adultos fue necesaria la homogenización por maceración de toda la muestra preservada en RNA later. La cuantificación se realizó en una balanza analítica hasta que el peso fue constante. La extracción se hizo continuamente, es decir, se obtuvieron al mismo tiempo el ARN total de cada etapa del desarrollo en todas las salinidades a las que fue expuesta. Posteriormente (el mismo día) se realizó el tratamiento con DNAsa para eliminar todo el ADN genómico (ver Anexos – Protocolo 6). La calidad del ARN obtenido se verificó con un gel de agarosa 1%, mientras que la cantidad y pureza con un espectrofotómetro asegurando valores de entre 1.8 y 2.2 (Nanodrop; ND-1000 LabTech). Las muestras de ARN se preservaron a -80 C hasta que se realizó la retrotranscripción.

Retrotranscripción (RT-PCR)

La RT-PCR para obtener el cADN se realizó con la retrotranscriptasa inversa M-MVL RT (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones (Com. pers. V. Boulo; ver Anexos – Protocolo 6). Se utilizó una concentración de 600 ng del ARN total extraído de cada una de las muestras. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pozos. La RT-PCR de todas las muestras (4 placas) se realizó en el mismo termociclador (Mastercycler, Eppendorf). Para verificar la calidad de la síntesis (cADN) se eligieron al azar 20 muestras por placa y se corrió un PCR de punto final para amplificar el gen L8 (169 pb) de *L vannamei* (Fig. 31; Ver anexos – Protocolo 7). Las

muestras de cADN se preservaron a -80 C hasta su análisis posterior por PCR en tiempo real. Las muestras fueron manipuladas en hielo en todo momento.

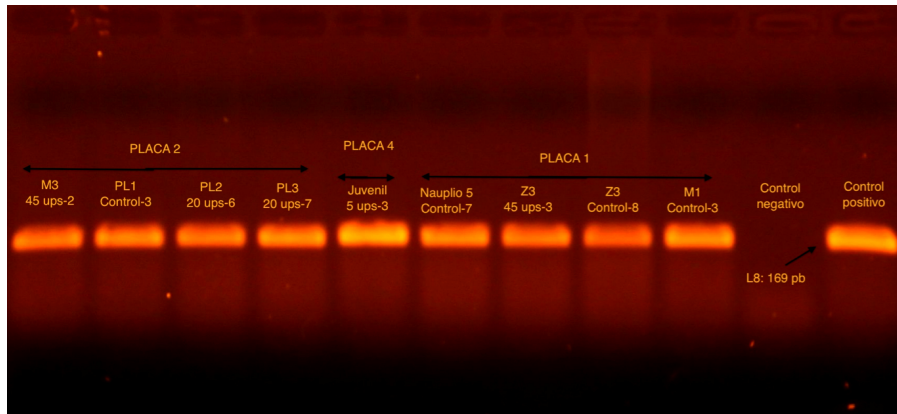


Figura 31. Electroforesis de productos PCR del gen L8 de muestras de *L. vannamei* en gel de agarosa (1%). Se seleccionaron 20 muestras de manera aleatoria de cada una de las cuatro placas (340 muestras). Control se refiere a la salinidad de agua de mar a 34 UPS. Para el control negativo se usó agua ppi y el control positivo corresponde a una muestra de cADN archivado de *L. vananmei*

9.2.2.2. Amplificación por PCR en tiempo real (qPCR)

Antes de realizar el análisis de qPCR se realizó un PCR de punto final con primers específicos para la α -NKA (Giffard-Mena, 2011) y verificar el tamaño del producto de amplificación esperado (179 pb); también se analizó el gen actina (627 pb) (ver Anexos – Protocolo 7) como control de la eficiencia del PCR. Esto se realizó en diversas muestras seleccionadas al azar utilizando 1 μ L de cDNA, sin importar la concentración (Fig. 32).

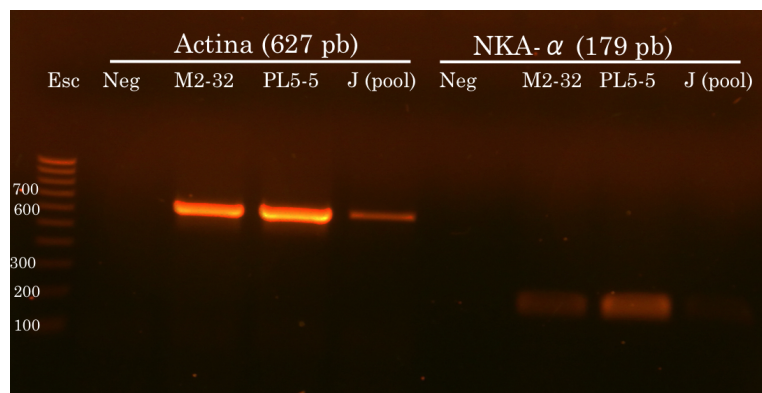


Figura 32. Electroforesis de productos PCR del gen actina y la α -NKA de muestras de *L. vannamei* en gel de agarosa (1%). Se seleccionaron 20 muestras de manera aleatoria de cada una de las cuatro placas (340 muestras). Control se refiere a la salinidad de agua de mar a 34 UPS. Para el control negativo se usó agua ppi y el control positivo corresponde a una muestra de cADN archivado de *L. vananmei*.

El número de copias de la NKA se cuantificó mediante qPCR. La técnica mide el nivel de fluorescencia emitida cuando un fluoróforo se adiciona al gen diana durante cada ciclo de amplificación. En esta investigación se utilizó el SyberGreen, el cual se une a los productos de doble cadena y emite luz a una longitud de onda de 520 nm. La amplificación se realizó en un termociclador Step One Plus de Applied Biosystems (ABI por sus siglas en inglés; Applied Biosystems Instruments).

Todas las reacciones fueron realizadas con la mezcla comercial “Fast SybrGreen® Master Mix 2X” en un volumen final de 10 µL (Protocolo8). Los cebadores flanquean una región de 179 pares de bases de la α-NKA (Giffard-Mena, 2011). Se realizó un análisis de expresión absoluta mediante curva estándar que se generó a partir de un producto purificado PCR de la α-NKA de juveniles de *L. vannamei*. El producto PCR utilizado se envió a secuenciar para conocer su tamaño exacto. El producto PCR se cuantificó en un nanodrop para obtener la concentración inicial (ng/µL) a partir de la cual se preparó una serie de dilución 1 en 10 desde 10e-1 hasta 10e-7. Se realizaron alícuotas de cada dilución y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

La concentración del producto PCR se transformó a número de copias mediante la fórmula:

$$\text{Número de copias}/\mu\text{L} = \frac{6.0022 \times 10^{23} [\text{moleculas/mol}] \times \text{DNA} [\text{g}/\mu\text{L}]}{660 \text{ Daltones} \times \text{tamano del fragmento} [\text{pb}]}$$

Donde:

6.022×10^{23} es el número de Avogadro y 660 Daltones corresponde al peso promedio de un solo par de bases (Schmittgen y Livak, 2008).

Determinación del número de copias de transcritos

Cada etapa del desarrollo se consideró un experimento independiente y se evaluó en una sola corrida (una etapa por placa de 96 pozos con todas las salinidades a las que fue expuesta). Cada muestra incluyó tres réplicas técnicas y entre seis y siete réplicas biológicas por tratamiento. Además en cada placa se incluyó una muestra como control positivo (cADN archivado de *L. vananmei*), una muestra como control negativo

(muestra de agua) y la curva estándar, todas con tres réplicas técnicas. Todo el procedimiento se realizó en hielo sobre una placa limpia.

El umbral (“threshold”) es el nivel de fluorescencia por encima de la línea base y se ajustó en la fase exponencial de la reacción, mientras que la línea base se ajustó con referencia a la primera curva de amplificación de acuerdo a lo recomendado por el fabricante del termociclador (manual ABI). La curva estándar fue evaluada con base en las condiciones recomendadas por el fabricante del termociclador (la pendiente entre -3.3 y -3.6, eficiencia > 96% 100%, y $R^2 > 98\%$). La cantidad de transcritos de la NKA para cada muestra se obtuvo directamente de los resultados generados por el termociclador a partir de la curva estándar y se expresan en número de copias.

Los valores se transformaron con logaritmo base 10 con el fin de aproximar la distribución de los datos a la distribución logarítmica de esta variable según lo recomendado por Derveaux *et al.* (2010). Las comparaciones entre tratamientos se hicieron con una prueba ANDEVA y una prueba Dunnet *a posteriori* para evaluar diferencias entre salinidades con respecto a la salinidad control (32 UPS). Los análisis se contrastaron con un valor de significancia α de 0.05. Las comparaciones se realizaron con el paquete estadístico Prism Graphpad versión 5.0a para Mac OS X (San Diego, California USA). Los resultados se graficaron de manera directa, con los datos sin transformar (media \pm SEM).

9.2.2.3. Procesado de muestras para determinar la ultraestructura celular

Las muestras descritas en la sección 9.2.1.2 y preservadas en glutaraldehído 1% fueron lavadas y postfijadas durante 1 hora en hielo con una solución de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% previamente ajustado con cacodilato de sodio. Los tejidos fueron lavados y deshidratados con una serie gradual de etanol. Las muestras fueron embebidas en resina LR White (Ted Pella, Inc.) y fueron polimerizadas durante dos días con luz UV. Las zonas de interés se ubicaron mediante cortes semifinos (0.5-1 μm) teñidos con azul de toluidina al 1%. Los cortes ultrafinos (60-90 nm) fueron cortados con navaja de diamante en un ultramicrotomo (Sorvall MT2), fueron montados sobre rejillas de cobre cubiertas con formvar y contrastados con acetato de uranilo al 4% y citrato de plomo al 2%.

El efecto de la salinidad se evaluó mediante comparaciones de la región apical y basolateral de la célula; donde un mayor desarrollo de estas, sugiere una mayor participación en la osmorregulación. Las observaciones se realizaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 200CX a 100 kV, facilitado por el Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología del IPICYT.

9.3. Resultados

9.3.1. Niveles de expresión de la ATPasa Na⁺/K⁺

La curva estándar utilizada en cada experimento (cada etapa del desarrollo) cumplió con los parámetros que se recomiendan con relación a la eficiencia de la reacción, pendiente y el coeficiente de correlación (Tabla 4). El análisis de la curva de disociación demostró que únicamente se amplificó un solo producto con una Tm de 79.5-79.6 °C (Fig. 33). El número de copias de la NKA de las muestras cayó dentro del intervalo de expresión establecido con la curva estándar (Fig. 34).

Tabla 4. Parámetros obtenidos de la curva estándar del qPCR de la α -NKA para cada etapas del desarrollo de *L. vannamei*. N3, Nauplio 3; Z3, Zoea 3; M2, Mysis 2; PL1, primer poslarva; PL4, poslarva de cuatro días. R², coeficiente de determinación.

Etapa	Pendiente	R ²	Eficiencia (%)
N3	-3.3	98	101
Z3	-3.4	99	98
M2	-3.5	99	96
PL1	-3.3	99	101
PL4	-3.4	99	97
Juvenil	-3.5	99	96
Adulto	-3.4	99	98

Deriva del reportero

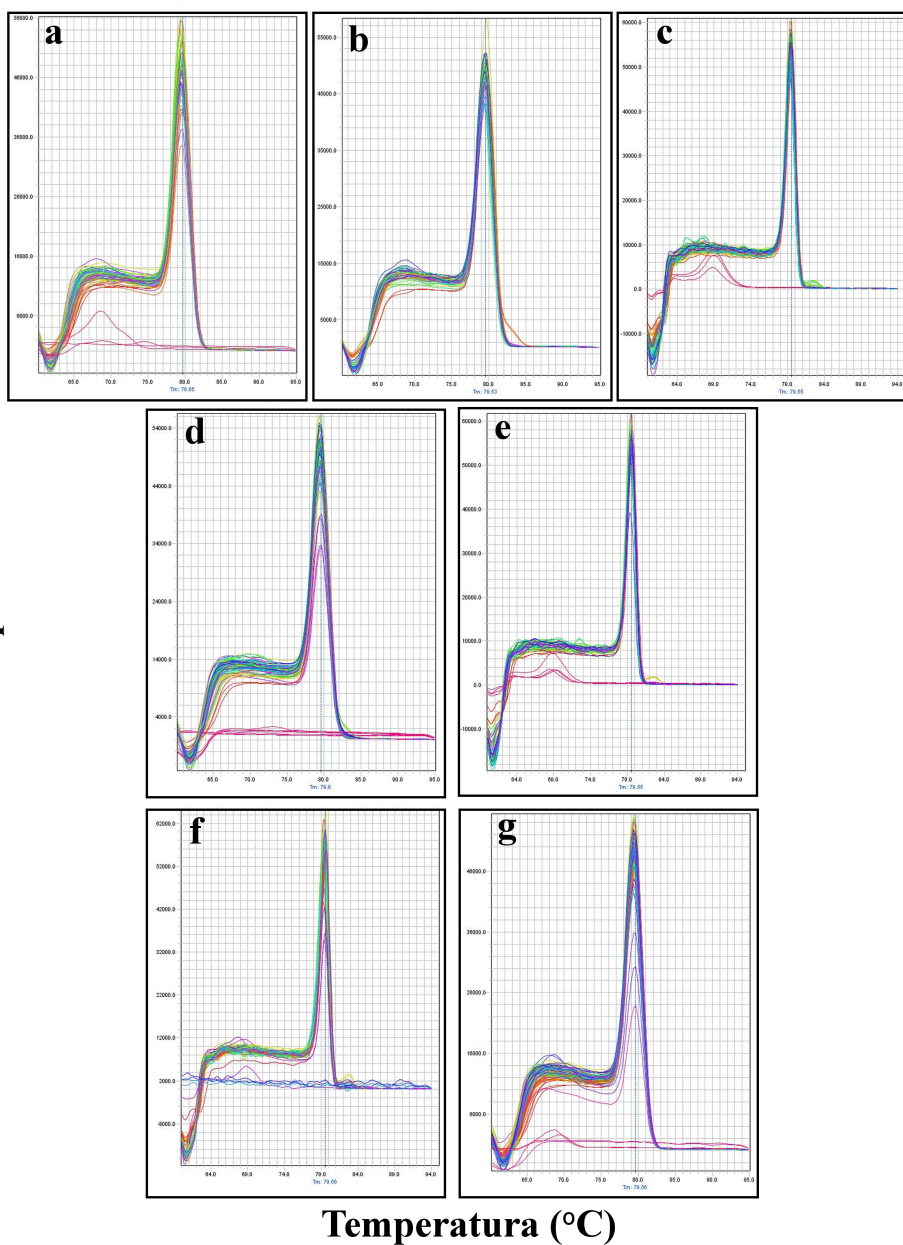


Figura 33. Curva de disociación de la NKA de diferentes etapas de *L. vannamei*. a, Nauplio 3; b, Zoea 3; c, Mysis 2; d, Poslarva 1; e, Poslarva 4; f, Juvenil; y g, Adulto. El pico de la curva corresponde a un producto de amplificación con una $T_m = 79.5-79.6$.

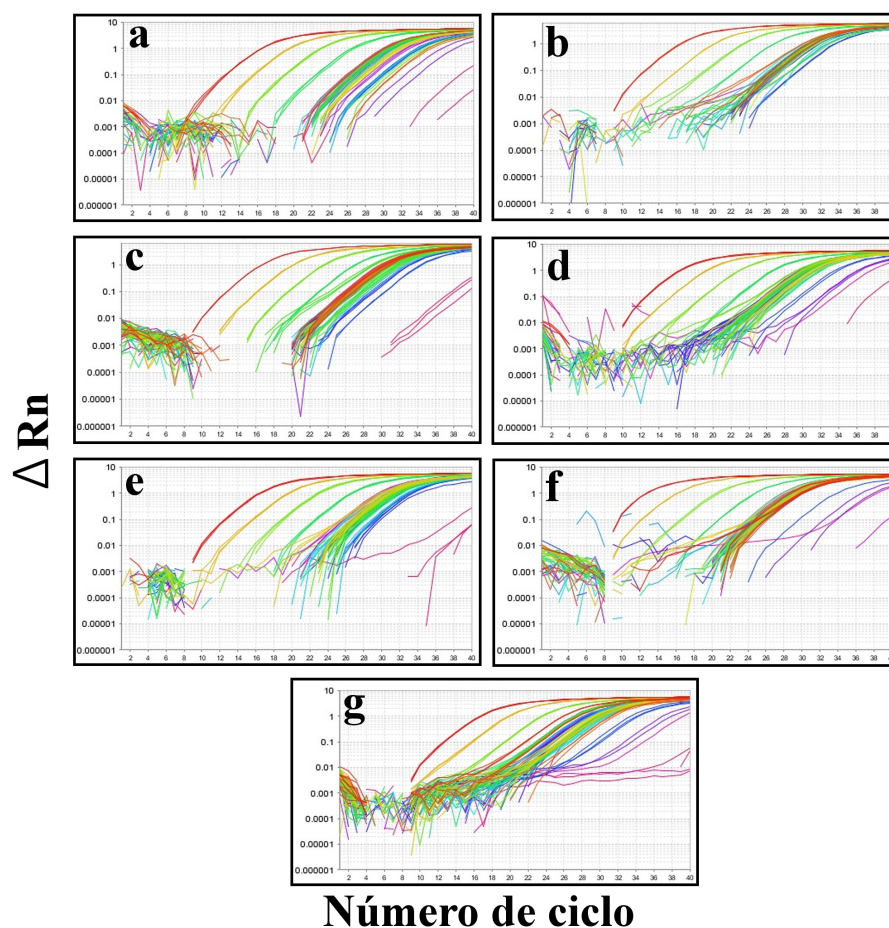


Figura 34. Diagrama de amplificación de la curva estándar y las muestras de tejido de *L. vannamei*. a, Nauplio 3; b, Zoea 3; c, Mysis 2; d, Poslarva 1; e, Poslarva 4; f, Juvenil; y g, Adulto. ΔRn , intensidad de la fluorescencia del sybr green/intensidad de fluorescencia pasiva.

Se detectó expresión de la NKA en todas las etapas y salinidades evaluadas. Con respecto a los valores en la salinidad control (32 UPS) la expresión cambió significativamente. En la etapa Nauplio 3 la expresión de la NKA fue mayor en las dos salinidades extremas; con una sobreexpresión del 789% en baja salinidad (20 UPS) y de 1,372% en alta salinidad (45 UPS) (Fig. 35a). En la etapa Zoea 3 la expresión de la NKA se suprimió significativamente 63% en la salinidad de 20 UPS, sin diferencias significativas entre 32 y 45 UPS (Fig. 35b). En contraste, en PL1 se detectó 84% de sobreexpresión en la salinidad de 45 UPS (Fig. 35d) sin diferencias significativas entre 32 y 20 UPS. Algo similar se observó en los adultos, en esta etapa la expresión incrementó significativamente un 397% en la salinidad alta de 60 UPS y fue igual entre

las salinidades de 32 y 10 UPS (Fig. 35g). En las etapas de Mysis 2, PL4 y juvenil no se detectó ninguna diferencia significativa por la salinidad (Fig. 35c, e y f).

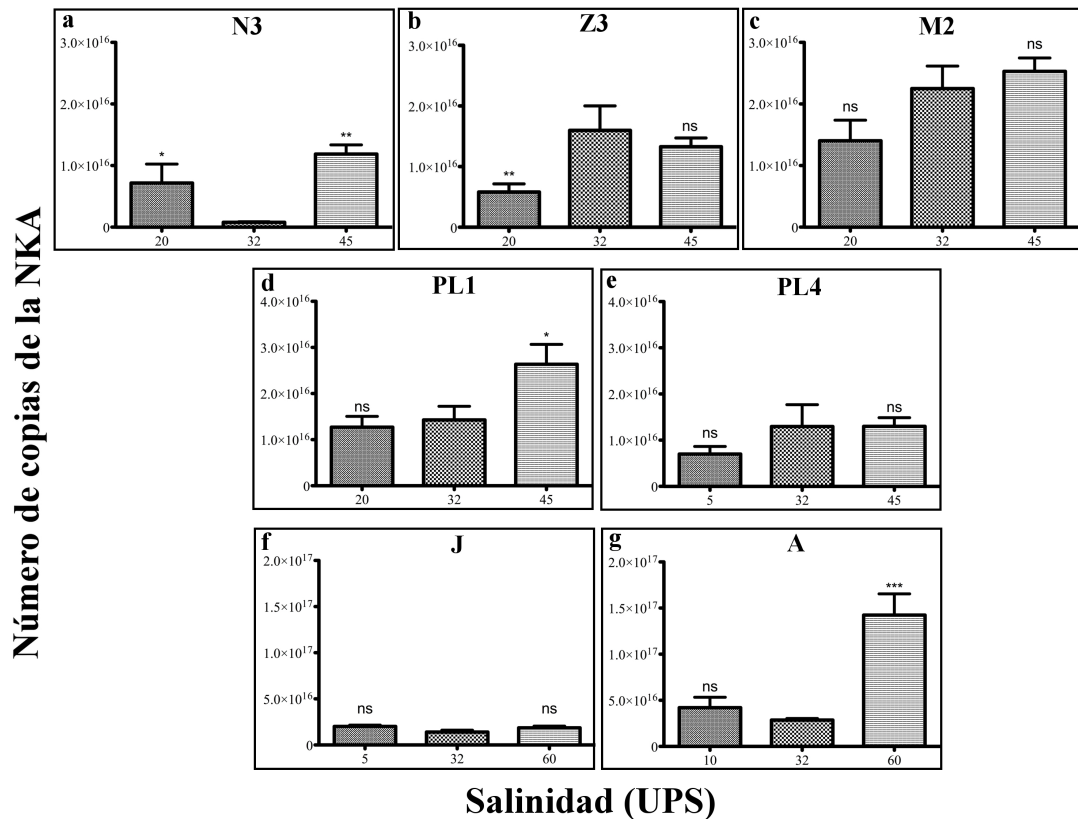


Figura 35. Niveles de expresión de los transcritos de la α -NKA en el desarrollo de *L. vannamei* (de la etapa naupliar hasta el adulto) en diferentes salinidades. Los valores fueron determinados mediante cuantificación absoluta y están expresados en número de copia. a, Nauplio 3; b, Zoea 3; c, Mysis 2; d, Poslarva 1; e, Poslarva 4; f, Juvenil; y g, Adulto. A, adulto; J, juvenil; M2, Mysis 2; N3, Nauplio 3; ns, no significativo; PL1, primer poslarva; PL4, poslarva de cuatro días; Z3, Zoea 3. Los asteriscos muestran las diferencias significativas con respecto a la salinidad de 32 ($p < 0.05$).

9.3.2. Ultraestructura celular de ionocitos en diferentes salinidades

Se observaron diferencias en la ultraestructura celular de los ionocitos cuando se compararon con las observaciones realizadas en la salinidad de 32 UPS (comportamiento hipo osmorregulador) (Fig. 20c, 22, 24). Las comparaciones únicamente se pudieron realizar en el Br y E de PL1 en 20 UPS, en el Br de PL15 en 5 UPS, y entre el E de juvenil en 5 y 45 UPS.

En la salinidad de 20 UPS (comportamiento hiper osmorregulador) el E de PL1 fue muy diferente al observado en la salinidad de 32 UPS. No se observó el espacio hemolinfático que separa a las dos capas de epitelio cúbico. Las células no presentaron

invaginaciones ni mitocondrias en el lado basal de la célula; en su lugar se observaron “prolongaciones” muy distintas a las observadas en cualquier otra célula de este trabajo. En el lado apical de la célula las microvellosidades estuvieron muy ordenadas y asociadas a mitocondrias pequeñas (Fig. 36a y b).

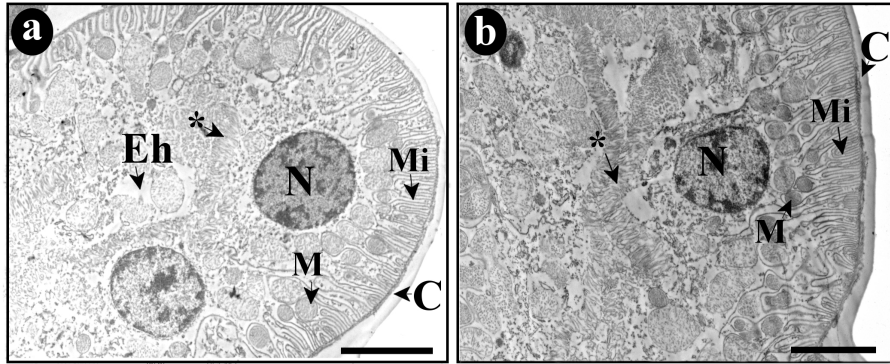


Figura 36. Ultraestructura del epipodito de PL1 de *L. vannamei* en la salinidad de 20 UPS. a, región apical del epipodito de PL1, donde se observa la región apical bien diferenciada con microvellosidades apicales asociadas a mitocondrias y la ausencia de la invaginación basal y del espacio hemolinfático; b, célula donde se observan las microvellosidades apicales asociadas a mitocondrias. C, cutícula; E, epipodito; In, invaginación basal; M, mitocondrias; Mi, microvellosidades; N, núcleo. Barra, 5 μ m.

En la salinidad de 45 UPS (hiperosmorregulación) la célula del E del juvenil presentó características ultraestructurales de ionocito, tales como la invaginación basolateral y apical asociadas a muchas mitocondrias (Fig. 37a y b) que caracterizó al E del adulto en la salinidad de 32 UPS (Fig. 26a). No obstante el lado apical de la célula del E del juvenil cambio drásticamente en la salinidad de 5 UPS (hiperosmorregulación) (Fig. 37c); las invaginaciones apicales se transformaron completamente y en su lugar se observaron prolongaciones de la membrana en forma de microvellosidades (Fig. 37d). La invaginación basal también se modificó y estuvo menos desarrollada (Fig. 37c) comparada con la invaginación basolateral en la salinidad de 45 UPS, aunque en ambas se observaron mitocondrias pequeñas (Fig. 37a y c).

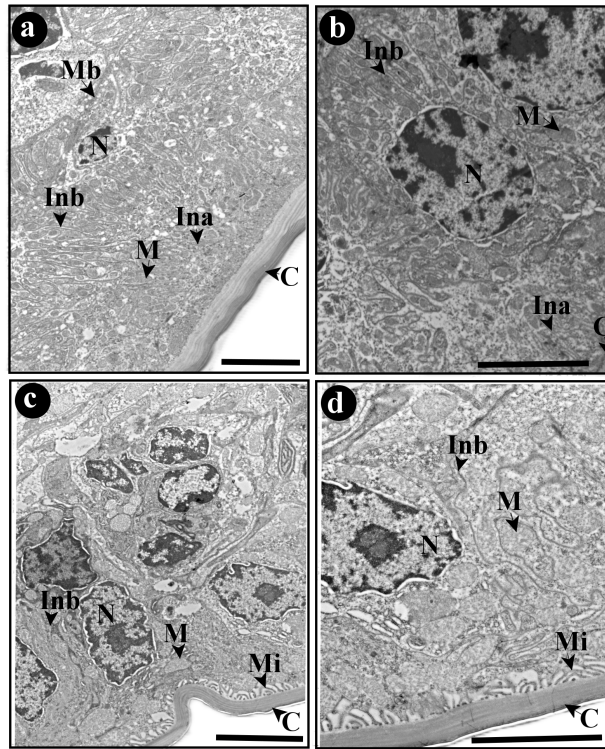


Figura 37. Ultraestructura celular del epipodito de juvenil de *L. vannamei* en 45 y 5 UPS. a, epipodito en 45 UPS, se indica el lado apical con invaginaciones y el lado basal con profundas invaginaciones asociadas a mitocondrias; b, ionocito del epipodito en 45 UPS, se indican las invaginaciones apicales y basales; c, epipodito en 5 UPS, se observan las microvellosidades apicales y la invaginación basal asociada a mitocondrias; d, región apical del epipodito en 5 UPS, se indican las microvellosidades bien diferenciadas y asociadas con mitocondrias. C, cutícula; E, epipodito; Ina, invaginación apical; Inb, invaginación basal; M, mitocondrias; Mb, membrana basal; Mi, microvellosidades; N, núcleo.

Otros cambios drásticos también se observaron en los Br en el comportamiento hiperosmorregulador (baja salinidad). Estas estructuras en las etapas PL1 y PL15 presentaron células con características de ionocito en el comportamiento hipoosmorregulador (Fig. 22b-c y 24b-c). Sin embargo en la salinidad de 20 UPS, la célula del Br de PL1 no presentó ninguna característica de ionocito (Fig. 38a), mientras que en el Br de PL15 en la salinidad de 5 UPS las invaginaciones basales fueron poco evidentes y las microvellosidades apicales observadas en la salinidad de 32 UPS (Fig. 24c) se transformaron en invaginaciones apicales (Fig. 38b y c).

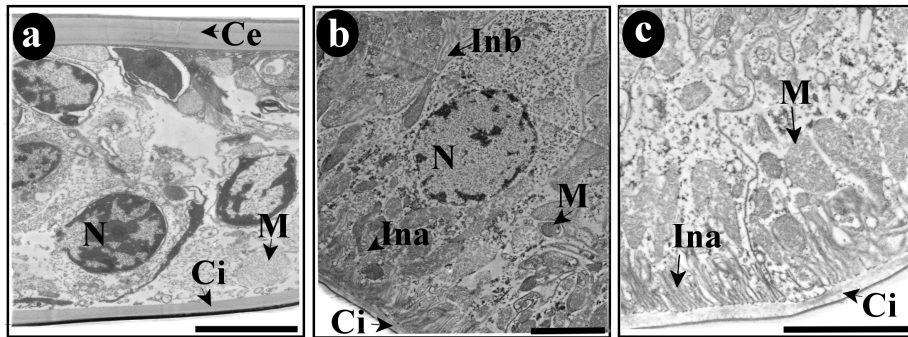


Figura 38. Ultraestructura celular del branquiostegito de *L. vannamei*. a, PL15 en 20 UPS; b y c, PL15 en 5 UPS. a, se observan las dos capas celulares no diferenciadas. b, se observa la célula prismática del branquiostegito de PL15 en 5 UPS con la membrana basolateral poco desarrollada; c, lado apical del ionocito del branquiostegito de PL15 sin las microvellosidades apicales. Br, branquiostegito; Ci, cutícula interna; Ce, cutícula externa; Ina, invaginación apical; Inb, invaginación basal; M, mitocondrias; N, núcleo. Barra, 5 μ m.

El epitelio de las G de todas las etapas analizadas (PL15, juvenil y adulto) presentó invariablemente células planas, independientemente de los cambios de salinidad (Fig. 39a-e).

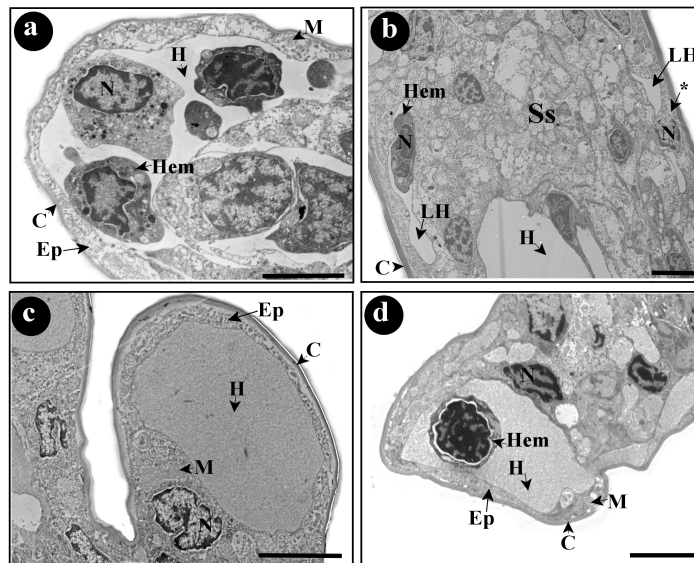


Figura 39. Ultraestructura celular de las branquias de *L. vannamei* en a) PL15, b, c, d) juvenil en distintas salinidades. a, corte transversal del séptum secundario de PL15 en 5 UPS, se indica la cutícula asociada con un epitelio muy delgado y hemocitos en circulación; b, corte longitudinal del séptum secundario de un juvenil en 5 UPS, se observa el epitelio plano y una célula pestaña (*); c, corte longitudinal de una lamela de juvenil en 5 UPS, se observa el epitelio plano por debajo de la cutícula y la lacuna hemolinfática en el ápice de la estructura; d, corte transversal del séptum secundario del juvenil en 45 UPS, se indica el epitelio plano por debajo de la cutícula y un hemocito en circulación. C, cutícula; Ep, epitelio; Hem, hemocito en circulación; LH, lacuna hemolinfática; M, mitocondrias; N, núcleo. Ss, séptum secundario. Barra, 5 μ m.

9.4. Discusión

El producto que se amplificó de la NKA fue el esperado de 179 pb con una T_m de 79.5-79.6 °C y corresponde al reportado para *L. vannamei* (Giffard-Mena, 2011).

Los resultados del análisis del tiempo real indican que en todas las etapas del desarrollo se llevó a cabo la transcripción del gen sin importar cuán desarrollados estén los organismos. Si bien la NKA es una proteína multifuncional que está relacionada no sólo con la osmorregulación sino también con otros procesos (Sáez *et al.*, 2009), las diferencias significativas en los valores de transcritos con respecto a la salinidad control (32 UPS) permiten suponer que hay un efecto del estrés salino que activa al mecanismo osmorregulador.

L. vannamei tiene la capacidad a nivel molecular para responder al estrés osmótico desde la etapa naupliar que no posee cámara branquial. Por lo que es muy probable que existan otras estructuras involucradas en la osmorregulación que capacitan a las larvas para osmorregular de manera activa tal como sucede con el langostino *M. amazonicum* en el cual se reporta una importante concentración de la NKA en la GA de las larvas (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013).

En Nauplio 3 hubo una importante sobreexpresión del gen en las dos salinidades extremas para la tolerancia (20 y 45 UPS) (Fig. 35a), mientras que en otras etapas del desarrollo sólo se detectó un cambio significativo de supresión en baja salinidad (Zoea 3) (Fig. 35b) o de incremento en alta salinidad (PL1 y adulto) (Fig. 35d y g). En ambos escenarios el patrón de la transcripción del gen fue mayor en las salinidades altas (45 UPS en larvas y PLs ó 60 UPS en adultos), lo cual implica que hay una mayor participación activa para regular la osmolalidad de la hemolinfa y por consiguiente un mayor gasto energético en salinidades altas, mientras que en las salinidades bajas evaluadas la participación activa del mecanismo osmorregulador parece ser menor.

La falta de diferencias significativas en Mysis 2, PL4 y juveniles e incluso la heterogeneidad de las diferencias significativas en el resto de las etapas evaluadas posiblemente ocurrieron por lo siguiente: 1) las salinidades de prueba no fueron lo suficientemente extremas para inducir la respuesta del mecanismo molecular como sugiere Lignot *et al.* (2000) y 2) la cuantificación se realizó antes o después de que

ocurriera la transcripción, considerando que este evento puede ocurrir en un solo episodio (Sun *et al.*, 2011).

Por otro lado debe considerarse que las diferencias observadas en los patrones de expresión de cada etapa y para cada salinidad podrían estar relacionadas también con la representatividad individual en las muestras de tejido, principalmente en aquellas donde hay grupos de organismos (larvas y poslarvas) o está conformada por la mezcla de branquias y epipoditos de dos organismos (juvenil). La muestra del adulto proviene de un solo individuo y aunque es mezcla de branquias y epipoditos, puede considerarse más representativa de la respuesta del mecanismo osmorregulador, ya que en este trabajo se demostró que las branquias no participan en la osmorregulación.

Los resultados encontrados en este trabajo para los adultos difieren a lo que se ha reportado para esta especie por Sun *et al.* (2011) en la salinidad de 1 a 7 UPS y por Pan *et al.* (2014) en la salinidad de 21 y 26 UPS. En estas salinidades los autores reportan un incremento en la expresión génica con respecto a la salinidad de 30 o 31 UPS, sin embargo, ellos cuantificaron la expresión del gen en las branquias por lo que es muy probable que sus resultados no representen la respuesta del mecanismo molecular de la NKA en la osmorregulación.

El efecto de la salinidad se observó en la ultraestructura de la membrana basal y apical de los ionocitos. Los resultados sugieren que los branquiostegitos observados, tanto de PL1 como de PL15, están menos implicados en el comportamiento hiperosmorregulador (baja salinidad). La ultraestructura celular del ionocito observado en la salinidad de 32 UPS (Fig. 22) desapareció en PL1 (Fig. 38a), mientras que en PL15 las microvellosidades que se observaron en la salinidad de 32 UPS (Fig. 24) cambiaron y fueron más similares a una invaginación (similar a la del epipodito del adulto y juvenil en 32 UPS y 45 UPS, respectivamente) (Fig. 26 y 37a). En contraste, la membrana apical del epipodito del juvenil que se observó con invaginaciones en la salinidad de 32 UPS se transformó (Fig. 37d) formando la típica microvellosidad reportada por efecto de la salinidad. En PL1 la célula cambió completamente en la salinidad de 20 UPS, la microvellosidad apical fue más ordenada pero la membrana basal se transformó completamente y no se observaron mitocondrias ni invaginación basal (Fig. 36b).

Estos resultados sugieren una participación diferente de las estructuras según la salinidad. Por el grado de desarrollo de la membrana apical del branquiostegito (evidenciado en PL1 y PL15) es muy probable que esta estructura tenga mayor participación en el comportamiento hipoosmorregulador (alta salinidad). Algo similar se ha reportado con base en diferencias de la IFI de la NKA en el langostino *M. amazonicum* de dos poblaciones. En estos organismos los branquiostegitos en la etapa juvenil tienen una mayor participación en el comportamiento hipoosmorregulador y casi ninguna participación en la hiperosmorregulación (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013). En el comportamiento hiperosmorregulador (baja salinidad), el lado apical de los ionocitos de los epipoditos de PL1 y del juvenil cambiaron completamente (Fig. 36b y 37c), el desarrollo de las microvellosidades (en particular en juvenil que no la tenía) tiene sentido para incrementar la superficie de contacto y tener una mayor absorción de iones en baja salinidad. Este cambio en la ultraestructura celular del ionocito se ha reportado en organismos expuestos a baja salinidad tales como *H. gammarus* (Haond *et al.*, 1998; Lignot y Charmantier, 2001) (Lignot y Charmantier, 2001), *M. amazonicum* (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2014) y el cangrejo *Ch. granulatus* (Genovese *et al.*, 2004).

Sería interesante contrastar el cambio a través del tiempo en la ultraestructura celular con la expresión proteica y génica tanto de la NKA como de otros transportadores en la ontogenia para analizar con mayor precisión el efecto de la salinidad a nivel celular y molecular en esta especie.

9.5. Resumen del capítulo III

- ◆ La expresión génica de la NKA se registró en todas las etapas del desarrollo de *L. vannamei*.
- ◆ Los niveles de expresión génica de la NKA en el Nauplio 3 con respecto a la expresión en 32 UPS se sobreexpresó 789% y 1,372% en 20 y 45 UPS, respectivamente.
- ◆ Los niveles de expresión génica de la NKA en Zoea 3 fueron iguales entre la salinidad de 32 y 45 UPS, y se suprimieron 63% en la salinidad de 20 UPS con respecto a la salinidad de 32 UPS.

- ◆ Los niveles de expresión en PL1 fueron iguales entre la salinidad de 20 y 32 UPS, e incrementaron 84% en la salinidad de 45 UPS con respecto a la salinidad de 32 UPS.
- ◆ Los niveles de expresión en adultos fueron iguales entre la salinidad de 10 y 32 UPS, e incrementaron 397% en la salinidad de 60 UPS con respecto a la salinidad de 32 UPS.
- ◆ No se detectaron diferencias significativas en los valores de expresión de la NKA en las etapas M2, PL4 y juvenil.
- ◆ El epipodito de PL1 en la salinidad de 10 UPS presentó microvellosidades apicales muy desarrolladas y mitocondrias pequeñas, pero el lado basal de la célula no presentó invaginaciones.
- ◆ El epipodito del juvenil en la salinidad de 5 UPS presentó microvellosidades apicales evidentes y una membrana basolateral con mitocondrias pequeñas.
- ◆ La ultraestructura de las células de las branquias de PL15, juvenil y adulto no se modificó con la salinidad.

10. Discusión general

Los crustáceos poseen estrategias osmorreguladoras que les permiten mantener estable la osmolalidad y la concentración iónica (principalmente de Na^+ y Cl^-) en su hemolinfa; presentan patrones osmorreguladores que son específicos y cambian durante la ontogenia (Charmantier y Charmantier-Daures, 2006; Péqueux *et al.*, 2006). En algunas especies se ha establecido que durante el desarrollo incrementan también las capacidades osmorreguladoras debido a la especialización de las estructuras de la cámara branquial (pleura, branquiostegitos, epipoditos y branquias) o la glándula antenal (Bouaricha *et al.*, 1994; Lignot y Charmantier, 2001; Cieluch *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2012a; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013). Las cuales poseen epitelios con ionocitos y un mecanismo molecular para el transporte de iones, dirigido principalmente por la actividad de la NKA que participa tanto en baja como en alta salinidad (Mantel y Farmer, 1983; McNamara y Faria, 2012).

En este estudio se determinó que la primer postlarva de *L. vannamei* marca el inicio del comportamiento hiper-hiposmorregulador que presentan los juveniles y adultos, por lo que su patrón de osmorregulación es del tipo III, en el cual la última metamorfosis marca el inicio del patrón osmorregulador de los adultos (Charmantier y Charmantier-Daures, 2006). El cambio en el patrón osmorregulador en PL1 coincidió con la especialización del branquiostegito como epitelio osmorregulador (presencia de ionocitos; Fig. 22b y c) y con la presencia de un primer epipodito también con ionocitos (Fig. 22e).

La capacidad para regular la osmolalidad de la hemolinfa incrementó progresivamente hacia la etapa de juvenil y adulto (Fig. 10), pero trascendió que las diferencias que mantienen entre la osmolalidad de la hemolinfa y la del ambiente en una misma salinidad o CO fueron iguales entre etapas del desarrollo poco o muy desarrolladas (*e.g.* PL1 vs juvenil), lo cual sugiere dos cosas: 1) *L. vannamei* mantiene el mismo gradiente osmótico durante su ontogenia y 2) el mantenimiento de este gradiente no está relacionado con el desarrollo de las estructuras. Por lo tanto es muy probable que esta especie utiliza también otras estrategias para regular la osmolalidad.

El establecimiento de la osmolalidad de la hemolinfa en *L. vannamei* sucede a los 30 min en las etapas PL5 y PL15 (datos nos mostrados) y en las etapas desde Mysis 2 hasta adulto, la osmolalidad de la hemolinfa ya se había estabilizado a las 12h. Esto sugiere que el establecimiento en esta especie ocurre más rápido cuando se compara con *P. japonicus*, en la cual son necesarias seis horas en PL10 y 12 h en juveniles (Charmantier *et al.*, 1988).

En contraste a la capacidad para mantener los valores de osmolalidad en la hemolinfa, la capacidad eurihalina de *L. vannamei* incrementó de sólo tolerar las salinidades de 20 a 45 UPS en todas sus etapas larvales y PL1 (Fig. 9) a tolerar salinidades más extremas como 5 ó 60 UPS en poslarvas de cuatro y veintidós días de crecimiento (PL4 y PL22), respectivamente. Lo que implica que hay una correlación entre su desarrollo y el aumento de sus capacidades eurihalinas, y por lo tanto en su capacidad para osmorregular de manera eficiente la osmolalidad de la hemolinfa como se observó mediante la prueba de pendientes (Fig. 10).

En *L. vannamei* primero se desarrollan los branquiostegitos y la pleura, después las branquias y los epipoditos. En los epipoditos y el lado interno del branquiostegito, la célula cambió progresivamente de célula cúbica a prismática, mientras que las células de las branquias fueron planas desde la primer poslarva, incluso en juveniles y adultos. Los resultados acerca de la función osmorreguladora de las estructuras de la cámara branquial indican que el epitelio cúbico de lado interno del branquiostegito y en los epipoditos posee características ultraestructurales de ionocito a partir de las etapas poslarvales (evidenciado en el branquiostegito y epipodito de PL1), pero es probable que en estas etapas la enzima NKA tenga poca actividad dado que no se detectó sino hasta en PL15.

A este respecto, existe también la posibilidad de que el mecanismo molecular de estas estructuras en las etapas poslarvales iniciales sea otro, ya que se ha demostrado por lo menos en juveniles o adultos de otras especies que la ubicación de los transportadores puede cambiar. En los adultos de la langosta *M. amazonicum*, la NKA y la ATPasa de H^+ no sólo están distribuidas (localizadas) de manera diferente en una misma estructura de la cámara branquial, sino que se localizan también en otras estructuras fuera de la

cámara branquial, como la glándula antenal (Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2014). Algo similar se ha reportado en el juvenil del camarón *L. stylirostris* donde el cotransportador NKCC se ubica en una célula distinta a donde se ubica la NKA (Pham *et al.*, 2012a). Esta diferencia en la localización celular de los transportadores reportado para otras especies posiblemente sea el porqué en los ionocitos “cubicos” de *L. vannamei* no se detectó la NKA o estuvo en muy baja concentración.

En *L. vannamei* los ionocitos “activos” por la presencia de la NKA se detectaron en PL15, juveniles y adultos. La NKA se distribuyó en el lado basolateral de la célula de los epipoditos y en el lado interno de los branquiostegitos, ambos formados por células prismáticas con características ultraestructurales de ionocito (evidenciado en el branquiostegito de PL15 y epipodito de adulto), por lo que en esta especie no hay una transferencia de la función osmorreguladora en las estructuras de la cámara branquial como se ha propuesta para otras especies (Bouaricha *et al.*, 1994; Lignot y Charmantier, 2001; Cieluch *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2012a; Boudour-Bouchecker *et al.*, 2013).

Es importante destacar que la presencia de la NKA en conjunto con la determinación de la ultraestructura celular de un ionocito durante la ontogenia de los camarones se ha documentado en muy pocos trabajos. *L. vannamei* presenta un desarrollo de ionocito más tardío cuando se compara con base en la ultraestructura celular reportada para *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994) y con base en la IFI para la NKA en *L. stylirostris* (Pham *et al.*, 2012a). No hay un trabajo que conjunte IFI y MET en estas especies. sin embargo con los reguladores que se tienen para cada especie los ionocitos están presentes desde la etapa Zoea en el branquiostegito y en la pleura, mientras que en *L. vannamei* se observó que en la etapa larval Mysis no hay células con ultraestructura de ionocito en el branquiostegito (Fig. 20d) ni estuvo presente la NKA en ningún epitelio de la cámara branquial, incluso ni en las primeras poslarvas (PL1, PL4). Por lo que la función de los ionocitos con otro mecanismo molecular o en conjunto con la NKA deberá ser investigado para profundizar en el entendimiento de cómo las etapas iniciales del desarrollo (PL1, PL4) son capaces de mantener el patrón hiper-hiposmorregulador.

Con estos resultados se demuestra que la capacidad eurihalina de *L. vannamei* está vinculada con la especialización celular de los epipoditos y branquiostegitos. En particular el número de epipoditos pudiese estar relacionado con los incrementos en la tolerancia, ya que a diferencia de los dos branquiostegitos (que están presentes desde Zoea) el desarrollo de los cinco epipoditos es gradual. En *L. vannamei* las branquias presentan una célula plana sin ninguna característica de ionocito, no presentan actividad de NKA ni la ultraestructura celular del típico ionocito descrito por Taylor y Taylor (1992), por lo que podrían estar más implicadas en el transporte gaseoso, como ocurre con el camarón *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994) o con la langosta *H. gammarus* (Haond *et al.*, 1998).

Por otro lado, los resultados del análisis de la expresión génica de la NKA indican que *L. vannamei* posee este mecanismo molecular desde etapas iniciales de su desarrollo (Nauplio 3), lo cual era de esperarse dado que es un mecanismo básico para mantener las concentraciones de Na^+ y K^+ en la célula (Sáez *et al.*, 2009). Las diferencias significativas de la transcripción de este gen que se detectaron en algunas etapas y salinidades se sugiere que este mecanismo tiene una participación en la osmorregulación.

En general los niveles de expresión génica fueron mayores en alta salinidad, lo cual implica que existe un mayor gasto energético en altas salinidades. En condiciones de alta salinidad los camarones experimentan una entrada pasiva de NaCl por lo que deben excretar de manera activa los excesos (Mantel y Farmer, 1983). En las etapas larvales es muy probable que la regulación de los iones sea crítica para la supervivencia dado que en estas etapas *L. vannamei* tiene un comportamiento de osmoconformación o de ligera hiperosmoconformación. En contraste en las poslarvas, juveniles y adultos la excreción debe ser lo suficientemente alta como para mantener la osmolalidad de la hemolinfa en niveles más bajos a los del ambiente (comportamiento de hipoosmorregulación). Posiblemente por esto las supervivencias en las salinidades altas fueron muy variables e incluso etapas como PL1 o PL3 no vivieron las 48h que duró el experimento, es muy probable que el déficit energético contribuyó a las mortalidad si se considera que los organismos se mantuvieron sin alimento.

Sin embargo, considerando que se ha reportado un desfase entre la transcripción y la actividad de la proteína (§ 2.2.2), es necesario correlacionar las dos respuestas para un mejor entendimiento del mecanismo molecular, ya que posiblemente el papel de la NKA para regular la osmolalidad de la hemolinfa es mucho más importante de lo que reflejan los resultados del qPCR, y la participación de la NKA ocurre por proteína preexistente más que por la síntesis de nueva proteína.

En las estructuras en las que fue posible evaluar el efecto de la salinidad mediante MET se detectó que hay un efecto en la membrana basal y apical de los ionocitos. En el comportamiento hiperosmorregulador (en baja salinidad), las microvellosidades apicales de los ionocitos del Br de PL1 desaparecieron mientras que las de PL15 cambiaron y fueron más parecidas a una invaginación (similar a la del epipodito del adulto y juvenil en 32 UPS y 45 UPS, respectivamente). Por otro lado, la invaginación apical del epipodito del juvenil se transformó en la típica microvellosidad reportada por efecto de la salinidad para incrementar la superficie de contacto. Esto sugiere que las estructuras tienen diferente participación según la salinidad y la capacidad para osmorregular de manera eficiente y tolerar las bajas salinidades está relacionada con el desarrollo de los epipoditos. De tal manera que durante su organogénesis se incrementa la habilidad para hiperosmorregular en salinidades bajas. Esta tolerancia se observó en PL1 y PL4 cuando por lo menos ya está presente un epipodito. Los branquiostegitos parecieran tener una mayor participación en el comportamiento hipoosmorregulador (evidenciado mediante ultraestructura celular en PL1 y PL15) como se ha descrito para los juveniles de la langosta *M. amazonicum* (Boudour-Bouchekeker *et al.*, 2013).

Sin embargo se recomienda profundizar en el análisis de las estructuras mediante MET ya que no se evaluaron todas las etapas del desarrollo ni en todas las salinidades. Además considerando que el mecanismo molecular cambia según la salinidad (McNamara y Faria, 2012), es importante considerar que para tener una imagen completa del proceso de osmorregulación deberá integrarse el análisis del resto de los transportadores relacionados con el proceso (particularmente los canales de Na⁺, la

ATPasa de H⁺, NKCC y/o CFTR), determinando su localización y evaluando sus niveles de actividad.

Las estructuras especializadas en el transporte iónico se adquieren de manera sucesiva y concuerda con los requerimientos que pudiese tener la especie en su hábitat natural. En los camarones las etapas larvales y poslarvales iniciales viven en el océano donde la salinidad es estable y por lo tanto la actividad de los epitelios osmorreguladores pudiese ser mínima. En contraste, una mayor capacidad para osmorregular es adquirida en las etapas poslarvales que se reclutarán al sistema estuarino para continuar su desarrollo y por lo menos en los juveniles que permanecen ahí hasta alcanzar su madurez sexual (FAO, 2004).

Los cambios observados en este estudio con respecto a las capacidades fisiológicas, moleculares y celulares en *L. vannamei* probablemente son el reflejo de las adaptaciones fisiológicas de la especie y está correlacionado con la distribución de las etapas larvales en los estuarios y zona costera como se ha descrito para otros camarones como *P. japonicus* (Bouaricha *et al.*, 1994) y *L. stylirostris* (Pham *et al.*, 2012b) con igual patrón osmorregulador y ciclo de vida.

11. Conclusiones

Los resultados de este trabajo proveen observaciones detalladas y novedosas con respecto al epitelio osmorregulador especializado de *L. vannamei*, particularmente resalta la importancia de los epipoditos y branquiostegitos en el comportamiento hiper e hipoosmorregulador, respectivamente. *L. vannamei* una especie que desde etapas tempranas del desarrollo (PL1) presenta el mismo patrón hiper-hipo osmorregulador de juveniles y adultos, pero sus capacidades eurihalinas incrementan progresivamente conforme las estructuras y sus epitelios se especializan en la osmorregulación.

La presencia de la NKA y de ionocitos típicos en los epitelios permiten tener una primera aproximación a cuáles son las estructuras de la cámara branquial implicadas en la osmorregulación y elucidar cómo su desarrollo pudiese estar relacionado con sus capacidades osmorreguladoras. De tal manera que el conocimiento de estas propiedades

pueden ser utilizadas para implementar métodos de cultivo de acuerdo a sus necesidades fisiológicas facilitando su desempeño productivo.

L. vannamei se puede aclimatar de manera directa con supervivencias de hasta el 100% en la salinidad de 20 y 45% en casi todas sus etapas del desarrollo (excepto M2-M3 que supervivieron únicamente 56% en 20 UPS). La aclimatación directa a la salinidad de 5 UPS se puede realizar a partir de PL4 con supervivencia de 71% o a partir de PL12 con una muy alta supervivencia (95%). La aclimatación directa a la salinidad de 60 UPS en etapas larvales o poslarvales iniciales no es recomendable ya que fue hasta PL22 cuando se detectó tolerancia a esta salinidad con una supervivencia de 22%. Solo juveniles y adultos demostraron capacidades para tolerar la salinidad de 60 UPS con supervivencias de 77 y 100%, respectivamente.

De esta manera la etapa clave en la aclimatación con altas supervivencias (e.g. 80-100%) dependerá de la magnitud del shock salino. En este trabajo se demostró que a partir de etapas poslarvales avanzadas (a partir de PL15) las estructuras anatómicas (ionocitos) y moleculares (NKA) están completamente desarrolladas y por lo tanto, existe mayor posibilidad para hacer frente a cambios bruscos en la salinidad. Pero deberá considerarse que en este trabajo se evaluó la eurihalinidad fisiológica y estos resultados si bien son un buen indicador de la respuesta a corto plazo para regular la osmolalidad de la hemolinfa y evitar la muerte, se requiere además verificar lo que sucede cuando los organismos se alimentan y crecen en condiciones de temperatura idóneas para el cultivo.

Finalmente, aunque *L. vannamei* tiene el comportamiento de hiper-hiposmorregulación desde la primer poslarva, es muy probable que el reclutamiento al sistema estuarino ocurra de manera más frecuente hasta en etapas poslarvales avanzadas (quizá desde PL15), cuando las estructuras de la cámara branquial involucradas con la osmorregulación (epipoditos y branquisotegitos) ya están desarrolladas y tienen una importante participación activa evidenciada por la existencia de ionocitos con la NKA.

12. Recomendaciones

- 1.- Evaluar la supervivencia de cada etapa del desarrollo en sus salinidades de tolerancia en condiciones de cultivo normales (temperatura, alimento).
2. - Determinar el límite de tolerancia letal de la etapa juvenil (salinidad <5 y >60).
- 3.- Determinar la capacidad osmorreguladora de la población silvestre.
4. Realizar la IFI en las etapas poslarvales con diferentes concentraciones de anticuerpo primario y secundario.
- 5.- Determinar la localización de la NKA en la cámara branquial en las diferentes etapas del desarrollo y en diferentes salinidades.
- 6.- Caracterizar la ultraestructura celular de la pleura en todas las etapas larvales.
- 7.- Caracterizar la ultraestructura celular del branquiostegito en la etapa adulta y juvenil.
- 8.- Utilizar un mayor número de muestra para la caracterización de la ultraestructura celular.
- 9.- Correlacionar la abundancia de la NKA con su nivel de actividad.
- 10.- Evaluar la presencia de otras proteínas de transporte iónico en la cámara branquial.
- 11.- Caracterizar la participación en la osmorregulación de otras estructuras fuera de la cámara branquial.

13. Literatura citada

- Abrunhosa, F. y Melo, M., (2008). Development and functional morphology of the foreguts of larvae and postlarvae of three crustacean decapods. *Brazilian Journal of Biology*. 68, 221-228.
- Anger, K., (2003). Salinity as a key parameter in the larval biology of decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development*. 43, 29-45.
- Anger, K., (2006). Contributions of larval biology to crustacean research: a review. *Invertebrate Reproduction and Development*. 49, 175-205.
- Aquacop, R., Le Moullac, G. y Damez, D., (1991). Modélisation de la résistance aux chocs de salinité des postlarves de *Penaeus vannamei*. *Aquatic Living Resources*. 4, 169-173.
- Balbi, F., Rosas, J., Velásquez, A., Cabrera, T. y Maneiro, C., (2005). Aclimatación a baja salinidad de postlarvas del camarón marino *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) provenientes de dos criaderos comerciales. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 40, 109-115.
- Bauer, R.T., (1999). Gill-Cleaning Mechanisms of a Dendrobranchiate Shrimp, *Rimapenaeus similis* (Decapoda, Penaeidae): Description and Experimental Testing of Function *Journal of Morphology*. 242, 125-139.
- Baxter-Lowe, L.A., Guo, J.Z., Bergstrom, E.E. y Hokin, L.E., (1989). Molecular cloning of the Na,K-ATPase α -subunit in developing brine shrimp and sequence comparison with higher organisms. *FEBS Letters*. 257, 181-187.
- Bhatt, J.J., (1978). Oceanography: Exploring the sea. D. Van Nostrand Company, New York.
- Bouaricha, N., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Thuet, J.-P. y Trilles, J.-P., (1991). Ontogénèse de l'osmorégulation chez la cravette *Penaeus japonicus*. *Cahiers de Biologie Marine*. 32, 149-158.
- Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, J.-P., Trilles, J.-P. y Charmantier, G., (1994). Ontogeny of Osmoregulatory Structures in the Shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Biological Bulletin*. 186, 29-40.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo, V., Charmantier-Daures, M., Grousset, E., Anger, K., Charmantier, G. y Lorin-Nebel, C., (2014). Differential distribution of V-type H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase in the branchial chamber of the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*. *Cell and Tissue Research*. 357, 195-206.
- Boudour-Bouchecker, N., Boulo, V., Lorin-Nebel, C., Elguero, C., Grousset, E., Anger, K., Charmantier-Daures, M. y Charmantier, G., (2013). Adaptation to freshwater in the palaemonid shrimp *Macrobrachium amazonicum*: comparative ontogeny of osmoregulatory organs. *Cell and Tissue Research*. 353, 87-98.
- Bradley, T.J., (2009). Animal Osmoregulation. Oxford University Press Inc., Oxford, New York.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L. y Leung-Trujillo, J.R., (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHVN virus and salinity. *Aquaculture*. 122, 133-146.

- Bückle, L.F., Barón, B. y Hernández, M., (2006). Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. *Revista de Biología Tropical*. 54, 745-753.
- Castille, F.L., Jr. y Lawrence, A.L., (1981). The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 68, 75-80.
- Cawthorne, D.F., Beard, T., Davenport, J. y Wickins, J.F., (1983). Responses of juvenile *Penaeus monodon* Fabricius to natural and artificial sea waters of low salinity. *Aquaculture*. 32, 165-174.
- Charmantier, G., (1998). Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invertebrate Reproduction and Development*. 33, 177-190.
- Charmantier, G. y Wolcott, D.L., (2001). Introduction to the Symposium: Ontogenetic Strategies of Invertebrates in Aquatic Environments. *American Zoology*. 41, 1053-1056.
- Charmantier, G. y Charmantier-Daures, M., (2006). The ontogeny of osmoregulation. en: Forest, J., V.J.C., V.K. (Eds.), *The Crustacea*. Brill, Leiden, Boston, pp. 205.
- Charmantier, G., Charmantier-Daures, M. y Aiken, D.E., (1991). Metamorphosis in the lobster *Homarus* (Decapoda): a review. *Journal of Crustacean Biology*. 11, 481-495.
- Charmantier, G., M. Charmantier-Daures, N. Bouricha, P. Thuet, D. E. Aiken y Trilles, J.-P., (1988). Ontogeny of Osmoregulation and Salinity Tolerance in Two Decapod Crustaceans: *Homarus americanus* and *Penaeus japonicus*. *The Biological Bulletin*. 175, 102-110.
- Chim, L., Bouveret, R., Lemaire, P. y Martin, J.L.M., (2003). Tolerance of the shrimp *Litopenaeus stylirostris*, Stimpson 1894, to environmental stress: interindividual variability and selection potential for stress-resistant individuals. *Aquaculture Research*. 34, 629-632.
- Chung, K.-F. y Lin, H.-C., (2006). Osmoregulation and Na,K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 144, 48-57.
- Cieluch, U., Charmantier, G., Grousset, E., Charmantier-Daures, M. y Anger, K., (2005). Osmoregulation, immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase, and ultrastructure of branchial epithelia in the developing brown shrimp, *Crangon crangon* (Crustacea, Decapoda). *Physiological and Biochemical Zoology*. 78, 1017-1025.
- Cieluch, U., Klaus, A., Aujoulat, F., Buchholz, F., Charmantier-Daures, M. y Charmantier, G., (2004). Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Biology*. 207, 325-336.
- CONAPESCA, (2009). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, México, pp. 155.
- Dall, W., (1981). Osmoregulatory ability and juvenile habitat preference in some penaeid prawns. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 54, 55-64.

- Davis, D.A., (2004). Acclimating Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to Inland, Low-Salinity Waters. *Southern Regional Aquaculture Center*.
- Davis, D.A., Saoud, I.P., McGraw, W.J. y Rouse, D.B., (2002). Considerations for *Litopenaeus vannamei* reared in inland low salinity waters. en: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N (Ed.), Avances en Nutrición Acuícola VI, Cancún, Quintana Roo.
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ahyong, S.T., Chan, T.-Y., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldmann, R.M., Fransen, C.H.J.M., Goulding, L.Y.D., Lemaitre, R., Low, M.E.Y., Martin, J.W., Peter K. L. Ng, Schweitzer, C.E., Tan, S.H., Tshudy, D. y Wetzer, R., (2009). A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology*, 1-109.
- Derveaux, S., Vandesompele, J. y Hellemans, J., (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 50, 227-230.
- Díaz, F., Farfan, C., Sierra, E. y Re, A.D., (2001). Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 34, 93-104.
- FAO, (2004). Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina, FAO Documento Técnico de Pesca, pp. 66.
- FAO, (2011). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA), Topic Fact Sheets. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO (en línea), Roma.
- Feng, C., Tian, X., Dong, S., Su, Y., Wang, F. y Ma, S., (2008). Effects of frequency and amplitude of salinity fluctuation on the growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*. 39, 1639-1646.
- Ferraris, R.P., Parado-Esteba, F.D., Ladja, J.M. y de Jesus, E.G., (1986). Effect of salinity on the osmotic, chloride, total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (FABRICIUS). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 83A, 701-708.
- Freire, C.A., Onken, H. y McNamara, J.C., (2008). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 151, 272-304.
- Furriel, R.P.M., McNamara, J.C. y Leone, F.A., (2000). Characterization of (Na⁺, K⁺)-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 126 303-315.
- Garza-Torres, R., Campos-Ramos, R. y Maeda-Martínez, A.M., (2009). Organogenesis and subsequent development of the genital organ in female and male Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*. 296, 136-142.
- Genovese, G., Luchetti, C.G. y Luquet, C.M., (2004). Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. *Marine Biology*. 144, 111-118.

- Genovese, G., C. M. Luquet, D. A. Paz, G. A. Rosa y Pellerano, G.N., (2000). The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialised cells. *Journal of Anatomy*. 197, 239-246.
- Giffard-Mena, I., (2011). *Litopenaeus vannamei* sodium-potassium ATPase alpha-subunit (NKA) mRNA, partial cds, NCBI.
- Giffard-Mena, I., González-Barradas, R.M., Arredondo-García, M.C., Lafarga de la Cruz, F., Granados-Machuca, C., López-Acuña, L.M. y David-True, C., (2014). La acuacultura en el valle de Mexicali: Especies y áreas de cultivo. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California.
- Gilles, R. y Pequeux, A., (1983). Osmotic and ionic regulation. en: Mantel, L.H. (Ed.), *The biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation*. Academic Press, Inc., New York, London, pp. 53-161.
- Haond, C., Flik, G. y Charmantier, G., (1998). Confocal Laser Scanning and Electron Microscopical studies on osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Homarus gammarus*. *Journal of Experimental Biology*. 201, 1817-1833.
- Hernández, R.M., Bückle, R., Fernando, Palacios, E. y Barón, B., (2006). Preferential behavior of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) by progressive temperature-salinity simultaneous interaction. *Journal of Thermal Biology*. 31, 565-572.
- Holliday, C.W., (1985). Salinity-Induced Changes in Gill Na,K-ATPase Activity in the Mud Fiddler Crab, *Uca pugnax*. *The Journal of Experimental Zoology*. 233, 199-208.
- Huong, D.T.T., Jasmani, S., Jayasankar, V. y Wilder, M., (2010). Na/K-ATPase activity and osmo-ionic regulation in adult whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to low salinities. *Aquaculture*. 304, 88-94.
- Hurtado, M.A., I. S. Racotta, R. Civera, L. Ibarra, M. Hernández-Rodríguez y Palacios, E., (2007). Effect of hypo- and hypersaline conditions on osmolality and Na⁺/K⁺-ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low- and high-HUFA diets. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 147 703-710.
- Jasmani, S., Jayasankar, V., Shinji, J. y Wilder, M.N., (2010). Carbonic anhydrase and Na/K-ATPase activities during the molt cycle of low salinity-reared white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries Science*. 76, 219-225.
- Jayasankar, V., Jasmani, S., Nomura, T., Nohara, S., Huong, D.T.T. y Wilder, M.N., (2009). Low Salinity Rearing of the Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Acclimation, Survival and Growth of Postlarvae and Juveniles. *JARQ*. 43, 345-350.
- Kitani, H., (1986). Larval Development of the White Shrimp *Penaeus vannamei* BOONE Reared in the Laboratory and the Statistical Observation of its Naupliar Stages. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 52, 1131-1139.
- Laramore, S., Laramore, C.R. y Scarpa, J., (2001). Effect of Low Salinity on Growth and Survival of Postlarvae and Juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 32, 385-392.

- Li, J., Ma, P., Liu, P., Chen, P. y Li, J., (2015). The roles of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit gene from the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* in response to salinity stresses. *Fish & Shellfish Immunology*. 42, 264-271.
- Lightner, D.V., (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of Penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Lignot, J.-H. y Charmantier, G., (2001). Immunolocalization of Na, K ATPase in the Branchial Cavity During the early Development of the European Lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 49, 1013-1023.
- Lignot, J.-H., Charmantier-Daures, M. y Charmantier, G., (1999a). Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase in the organs of the branchial cavity of the european lobster *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Cell Tissue Research*. 296, 417-426.
- Lignot, J.-H., C. Spanings-Pierrot y Charmantier, G., (2000). Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. 191 209-245.
- Lignot, J.H., Cochard, J.C., Soyeux, C., Lemaire, P. y Charmantier, G., (1999b). Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 170, 79-92.
- Lovett, D.L., T. Colella, Cannon, A.C., Lee, D.H., Evangelisto, A., Muller, E.M. y Towle, D.W., (2006). Effect of Salinity on Osmoregulatory Patch Epithelia in Gills of the Blue Crab *Callinectes sapidus*. *Biological Bulletin*. 210, 132-139.
- Lucu, C. y Flik, G., (1999). Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.
- Luquet, C.M., Dirk, W., Mihaela, S. y Towle, D.W., (2005). Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *Journal of Experimental Biology*. 208, 3627-3636.
- Mantel, L.H. y Farmer, L.L., (1983). Osmotic and ionic regulation. en: Mantel, L.H. (Ed.), *The biology of Crustacea: 5. Internal anatomy and physiological regulation*. Academic Press, Inc., New York, London, pp. 53-161.
- Martin, J.W., Liu, E.M. y Striley, D., (2007). Morphological observations on the gills of dendrobranchiate shrimps. *Zoologischer Anzeiger*. 246, 115-125.
- Martinez, A.S., Charmantier-Daures, M., Compère, P. y Charmantier, G., (2005). Branchial chamber tissues in two caridean shrimps: the epibenthic *Palaemon adspersus* and the deep-sea hydrothermal *Rimicaris exoculata*. *Tissue and Cell*. 37, 153-165.
- Martínez-Porchas, M., Rafael, M.n.-C.r.L. y Ramos-Enríquez, R., (2009). Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 10.
- McGraw, W.J., Davis, D.A., Teichert-Coddington, D. y Rouse, D.B., (2002). Acclimation of *Litopenaeus vannamei* Postlarvae to Low Salinity: Influence of Age, Salinity Endpoint, and Rate of Salinity Reduction. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33, 78-84.
- McKenney, C., Jr. y Celestial, D.M., (1995). Interactions among salinity, temperature and age on growth of the estuarine mysid *Mysidopsis bahia* reared in the

- laboratory through a complete life cycle. *Journal of Crustacean Biology*. 15, 169-178.
- McNamara, J.C. y Faria, S.C., (2012). Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapod Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 1-18.
- Medina-Reyna, C.A., (2001). Growth and Emigration of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in the Mar Muerto Lagoon, Southern Mexico. *Naga, The ICLARM Quarterly*. 24.
- Mendonça, N.N., D.C. Masui, J.C. McNamara, F.A. Leone y Furriel, R.P.M., (2007). Long-term exposure of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* to elevated salinity: Effects on gill (Na⁺,K⁺)-ATPase α -subunit expression and K⁺-phosphatase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 146 534-543.
- Osse, J.W.M., van den Boogaart, J.G.M., van Snik, G.M.J. y van der Sluys, L., (1997). Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture*. 155, 249–258.
- Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D. y Racotta, I.S., (2004). Survival, Na⁺/K⁺-ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*. 234, 497- 511.
- Pan, L., Liu, H. y Zhao, Q., (2014). Effect of salinity on the biosynthesis of amines in *Litopenaeus vannamei* and the expression of gill related ion transporter genes. *Journal of Ocean University of China*. 13, 453-459.
- Pan, L.-Q., Zhang, L.-J. y Liu, H.-y., (2007). Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*. 273 711-720.
- Péqueux, A., (1995). Osmotic Regulation in Crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*. 15, 1-60.
- Péqueux, A., Dandrifosse, G., Loret, S., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Spanings-Pierrot, C. y Schoffeniels, E., (2006). Osmoregulation: Morphological, physiological, bio-chemical, hormonal, and developmental aspects. en: Forest, J., Klein, J.C.v.V. (Eds.), *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea*. Brill, Leiden, Boston, pp. 205.
- Pham, D., Charmantier, G., Boulo, V., Wabete, N., Grousset, E. y Charmantier-Daures, M., (2012a). Osmoregulation in the penaeid shrimp *Litopenaeus stylirostris*: ontogeny and localization of transporters, SICB Annual Meeting, Charleston, SC, USA.
- Pham, D., Charmantier, G., Wabete, N., Boulo, V., Broutoi, F., Mailliez, J.-R., Peignon, J.-M. y Charmantier-Daures., M., (2012b). Salinity tolerance, ontogeny of osmoregulation and zootechnical improvement in the larval rearing of the Caledonian Blue Shrimp, *Litopenaeus stylirostris* (Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture*. 362-363, 10-17.
- Pittman, S.J. y McAlpine, C.A., (2001). Movements of Marine Fish and Decapod Crustaceans: Process, Theory and Application. *Advances In Marine Biology*. 44, 205-292.

- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A. y Ross, L.G., (1997). The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*. 157, 107-115.
- Ramos-Carreño, S., Giffard-Mena, I., Valencia-Yañez, R., Correa-Sandoval, F., Ruíz-García, N. y Díaz-Herrera, F., (2013). White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection in *Penaeus vannamei* exposed to extreme salinities. *Archives of Virology*. in press.
- Ramos-Cruz, S. y Ramos-Santiago, E., (2006). Abundancia relativa de postlarvas de camarones penéidos en la Bahía Salinas del Marqués, Golfo de Tehuantepec, México. Marzo a Junio de 1999. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 41, 121-128.
- Randall, D.J., et al., (1998). Eckert Fisiología Animal: Mecanismos y Adaptaciones. McGraw-Hill Interamericana, España.
- Rodríguez-Pérez, B.P., Medina-Arredondo, M. y Escobedo-Bonilla, C.M., (2006). Estadios de muda de camarones (*Litopenaeus vannamei*) adultos sanos y susceptibilidad al virus de mancha blanca (WSSV), VII Encuentro de Biotecnología, Mazatlán, Sinaloa. Octubre 11-13, 2010.
- Sáez, A.G., Lozano, E. y Zaldívar-Riverón, A., (2009). Evolutionary history of Na,KATPases and their osmoregulatory role. *International Journal of Genetics and Evolution*, 1-27.
- Shekhar, M.S., Kiruthika, J., Rajesh, S. y Ponniah, A.G., (2014). High salinity induced expression profiling of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus monodon*). *Molecular Biology Reports*. 41, 6275-6289.
- Singh, T., (1980). The isosmotic concept in relation to the aquaculture of the giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 20, 251-256.
- Sowers, A.D., Young, S.P., Grosell, M., Browdy, C.L. y Tomasso, J.R., (2006). Hemolymph osmolality and cation concentrations in *Litopenaeus vannamei* during exposure to artificial sea salt or a mixed-ion solution: Relationship to potassium flux. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 145, 176-180.
- Spanings-Pierrot, C., (2006). Neuroendocrine control of osmoregulation. en: Forest, J., Klein, J.C.v.V. (Eds.), *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea*. Brill, Boston.
- Sun, H., Zhang, L., Ren, C., Chen, C., Fan, S., Xia, J.J., Lin, H. y Hu, C., (2011). The expression of Na, K-ATPase in *Litopenaeus vannamei* under salinity stress. *Marine Biology Research*. 7, 623-628.
- Taylor, H.H. y Taylor, E.W., (1992). *Gills and Lungs: The Exchange of Gases and Ions, Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, Inc, pp. 203-293.
- Towle, D.W., Paulsen, R.S., Weihrauch, D., Kordylewski, M., Salvador, C., Lignot, J.-H. y Spanings-Pierrot, C., (2001). Na⁺⁺K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity-related expression of a-subunit mRNA and protein. *Journal of Experimental Biology*. 204, 4005-4012.
- Valdéz, G., Fernando Díaz, Re, A.D. y Sierra, E., (2008). Efecto de la salinidad sobre la fisiología energética del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Hidrobiológica*. 18, 105-115.

- Vernberg, F. y Vernberg, W., (1975). Adaptations to extreme environments. University of South Carolina Press, Columbia.
- Wang, L., Wang, W.-N., Liu, Y., Cai, D.-X., Li, J.-Z. y Wang, A.-L., (2012). Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress. *Molecular Biology Reports*. 39, 6427-6438.
- Wilson, I. y Gamble, M., (2002). The Hematoxylin and Eosin. en: Bancroft, J.D., Gamble, M. (Eds.), Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London.
- Zhang, P., Zhang, X., Li, J. y Gao, T., (2009). Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*. 40, 1419-1427.
- Zhu, C., Dong, S., Wang, F. y Huang, G., (2004). Effects of Na/K ratio in seawater on growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 234, 485-496.

14. Anexo

14. 1. Protocolos

1. Deshidratación Alcohol – Benceno para crustáceos y desparafinación

Deshidratación en Histoquinet-21 hrs	Deparafinación
Alcohol 70%	<i>Las laminillas se precalentaron 30min a 50 °C</i>
Alcohol 80%	Xileno (10 min)
Alcohol 100%	Xileno (5 min)
Alcohol 100%	Xileno (5 min)
Alcohol 100%	Alcohol 96% (5 min)
Alcohol-benceno	Alcohol 96% (5 min)
Benceno	Alcohol 80% (5 min)
Benceno	Alcohol 70% (5 min)
Benceno-parafina	Alcohol 50% (5 min)
Parafina	Agua formolada hasta la tinción

2. Tinción Hematoxilina y Eosina para tejido de camarón *L. vannamei* en diferentes etapas del desarrollo (de Nauplio a Adulto).

Estandarizado en el laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias. Jennyfers Chong y Deyanira Rodarte.

Solución filtrada	Tiempo
Hematoxilina de Harris	2 minutos
Lavar con agua de la llave	3 o 5 veces, hasta eliminar hematoxilina. Utilizar por lo menos tres recipientes con agua.
Alcohol ácido	Virar a rosa
Lavar con agua de la llave	3 o 5 veces
Carbonato de litio saturado	Virar a violeta
Lavar con agua destilada	3 o 5 veces
Sol. Eosina Y-Floxina B	30 segundos
Alcohol 96	5 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol-xileno	10 minutos
Xileno	Hasta montar
Montar en resina sintética	

3. Preparación de laminillas Poli L lisina

- Sumergir las laminillas durante 15 min en alcohol 100%
 - Retirar una por una y envolver todas en papel aluminio
 - Secar en una mufla durante 60 min a 300 °C
 - Dejar enfriar por una hora
 - Sumergir las laminillas durante 15 min en una solución filtrada de Poli L lisina (0.01%) preparada con agua destilada
 - Sacar las laminillas una por una y secar verticalmente a temperatura ambiente
 - Una vez secas, guardarlas en gradillas de vidrio forradas con papel aluminio y dejar toda la noche a 50 °C.
 - Conservar las laminillas a 4 °C
-

4. Inmunofluorescencia Indirecta

Protocolo utilizado en la UM2 (Montpellier, Francia) para muestras de crustáceos

En esta tesis se realizaron algunas modificaciones

SOLUCIONES			
Solución PBS (Phosphate Buffered Saline) Volumen 2 L Disolver 10 tabletas de PBS en 2000 mL de agua destilada. Ajustar pH a 7.3 con HCl o NaOH	Solución A 200 mL de PBS 1.75 g de NaCl 40 µL de Tween 20 (se agrega el día del experimento) Ajustar pH a 7.3 (HCl o Na OH)	Solución PBS-R 5%. 200 mL de PBS 10 g de leche descremada. Se disuelve en calor (40-45 °C) pero evitar que hierva. Usar la solución a temperatura ambiente.	Solución PBS-R 0.5 % (temperatura ambiente.) Diluir la PBS-R 5% diez veces, es decir, 1 mL y 9 mL de PBS-R 5%)

Anticuerpos : 100 µL por laminilla (*se utilizaron 150 uL*)
 10 µg/mL de ambos anticuerpos preparados con PBS-0.5%

ACI: ATPasa Na⁺/K⁺ - α5 del pollo *Gallus gallus* ACII: Anti-IgG de ratón expresado en chivo, unido al fluorocromo FITC (Johnson & Inmuno).
 (Fambrough, D.; Universidad de Iowa).

DEPARAFINAR

En esta tesis se precalentaron las laminillas por 30 min a 45 °C.

1. Xileno	10 min	5. Alcohol 95 %	5 min
2. Xileno	10 min	6. Alcohol 90%	5 min
3. Butanol	5 min	7. Alcohol 70%	5 min
4. Alcohol 100%	5 min	8. Alcohol 50%	5min
		9. PBS	5 min

BLOQUEAR

Solución A	10 min
PBS-R 5%	20 min
PBS	3 baños de 2 min.

MARCAJE

ANTICUERPO I

ANTICUERPO II

En esta tesis el lavado de las muestras se realizó con PBS + Tween 20 (0.02%)

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Poner agua a la cámara húmeda • Acomodar las laminas una por una en la base de la cámara • Poner cuidadosamente, con ayuda de un cubreobjetos, 100 µL de la solución Anticuerpo I a cada laminilla. • Tapar la cámara y dejarla durante 2 h en el agitador a nivel lento. Se deja a temperatura ambiente. Proteger del exceso de luz • Lavar las laminas en PBS. 3 baños de 5 min (se puede usar el ultimo PBS del bloqueo). | <ul style="list-style-type: none"> • Acomodar las laminillas en la cámara húmeda y poner la solución Anticuerpo II al igual que para el anticuerpo I, excepto la luz. PROTEGER DE LUZ en todo el proceso. • Dejar una hora a temperatura ambiente y agitación suave. • Lavar las laminas en PBS. 3 baños de 5 min (se puede usar el ultimo PBS del bloqueo). Todo en la oscuridad. • Montar las laminillas. Todo en oscuridad • Poner las laminillas verticalmente u horizontalmente para secar, protegidas de la luz, e incluso protegerlas durante la observación |
|--|--|

5. Extracción de RNA

TRIreagent SIGMA -(50mg de tejido preservado en RNA later)

PROTOCOLO

Antes de iniciar, enjuagar el tejido con agua ppi para eliminar el RNA later

Homogenizar en 500 µl de TRI Reagent—VORTEX. Puntas de 1000µl con filtro

Congelar a -80 por 15 min.

Desintegrar el tejido con agitador. Pistilos limpios y estériles.

Centrifugar- 4 °C 12000g/10min

Recuperar sobrenadante. Puntas de 1000 µl con filtro

5 min. en temp. ambiente (TA)

Añadir 500 µl 1-bromo-3-cloropropano - VORTEX -15 seg.

2 min. TA

Centrifugar- 4 °C 12000g/15min

Transferir fase acuosa a tubo limpio. No mezclar las fases, sólo extraer la de arriba con punta de 200

En los tubos limpios añadir 250µl de 2-propanol--- MEZCLAR

5 min. TA

Centrifugar- 4 °C 12000g/10min

Remover sobrenadante. Escurrir bien, poner boca abajo los tubos sobre un papel secante

Añadir 500µl de etanol 75%-VORTEX

Centrifugar- 4 °C 12000g/5min

Eliminar liquido. Escurrir bien, poner boca abajo los tubos sobre un papel secante

5 min. TA

Disolver en agua ppi, de entre 15 y 100 µl. Según tamaño de la pastilla. Aprox. 30%

6. Tratamiento de DNAsas y Retrotranscripción

Tratamiento de DNAsas

Trabajar con tubos 0.5ml PCR clean, puntas con filtro y siempre en frío.

Tomar 50 µl de RNA. Sin importar la concentración. Ajustar con agua ppi estéril si no hay suficiente.

Centrifugar

Añadir 5.5 µl DNase Reaction 10x Buffer (Invitrogen. 18063-015 o AMRESCO)

Centrifugar

Añadir 2µl DNase enzyme-Deoxyribonuclease I (Invitrogen. 18063-015). Recomendado: 1u/µl----

1000µg RNA

Centrifugar

Incubar 37 °C /30min en maquina PCR

Hielo 2-5min.

Incubar 65 °C/10min en maquina PCR (inactiva enzima)

Hielo

5 µl NaAc (1/10 vol) 3 M pH 5.2. CENTRIFUGAR. (precipitación)

2 µl Glicogeno (10mg/ml). CENTRIFUGAR.

162 µl (2.5 vol) Etanol 100% a -20 °C. CENTRIFUGAR

1 h a -20 °C o 15 min a -80 °C

Centrifugar- 4 °C 12000g/30min (Colocar adaptadores para tubos)

Tirar el alcohol, preservar pellet

Secar 5 min. TA. Escurrir bien, poner boca abajo los tubos sobre un papel secante

Disolver en agua ppi UV, de entre 15 y 20µl. Según tamaño de la pastilla.

Retrotranscripción - (1-5µg de RNA total. SIGMA)			
REACCIÓN 1. SE PUEDE	Vol µl	REACCIÓN 2. SE PUEDE	Vol µl
HACER MIX.		HACER MIX.	
dNTPs mix – 10mM	1	10x M-MLV RT- Buffer	2
Oligo dT -0.70µM	1	M-MLV RT- Enzima	1
Agua ppi UV	1	RNAsa inhibitor (30-50u/µl)	0.3 (Prot. 0.5)
RNA templado	(600 ng)	Agua ppi UV	6.7 (Prot. 6.5)
TOTAL	10	TOTAL	10 (+ 10 de la Rx 1= 20)
Agitar suavemente y centrifugar . Incubar a 70 °C por 10min. HIELO y continuar en frío.		Incubar a 37 °C /60 min (Anillado e inhibición, RT) Incubar a 80 °C/10min (Inactivar RT) Conservar muestras a -20 °C (-80 en esta tesis)	

7. PCR de punto final

Reacción de 25 μ l		Perfil de amplificación		
Reactivos	Vol μ l	Temperaturas	Tiempo	
Buffer comercial- 1x	5	95 °C	5 min.	30 ciclos
MgCl ₂ – 3mM	3	94 °C	1 min.	
dNTPs mix – 0.4mM	1	Tm=60 °C	30 seg.	
Cebadores Forward – 0.4mM	1	72 °C	1 min.	
Cebadores Reverse- 0.4mM	1	72 °C	5 min.	
Agua ppi UV	12.8	Tm para el gen L8, NKA, y Actina de <i>L. vannamei</i>		
Enzima	0.2			
cDNA-	1			
TOTAL	25			

8. qPCR para la α -NKA de *L. vannamei*

Reacción de 10 μ L		Perfil de amplificación		
Reactivos	Vol. (μ L)	Temperaturas	Tiempo	
Master Mix Sybr Green	5			
Cebador F (10 μ M) 5'- CCA GTA TGA CAA GAC CTC - 3'	0.4	95 °C	20 seg.	40 ciclos
Cebador R (10 μ M) 5'- CCT TAA CAT CAC CAA CAG CC-3'	0.4	95 °C	0.05 seg.	
cDNA	0.5	Tm= 60 °C	30 seg.	
Agua ppi	3.7	Tm para la NKA		