

Centro de Investigación en
Alimentación

Y Desarrollo, R. L.

**CARACTERIZACION LIPIDICA DEL PLASMA Y LA
HDL PLASMATICA DEL
CAMARON BLANCO *Penaeus vannamei***

POR

LYDIA MARICELA RUIZ VERDUGO

**TESIS APROBADA POR LA
DIRECCION DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN NUTRICION Y ALIMENTOS**



CONTENIDO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCION.....	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
Lípidos en la Nutrición y Fisiología del Camarón.....	4
Ácidos Grasos Esenciales.....	5
Fosfolípidos.....	7
Colesterol.....	8
Lipoproteínas y Transporte de Lípidos en Crustáceos.....	10
Lipoproteínas.....	10
Transporte de Lípidos.....	12
Lipoproteínas de Transporte en Crustáceos.....	14
OBJETIVOS.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Particulares.....	16
MATERIALES Y METODOS.....	17
Muestreo.....	17
Extracción de Hemolinfa.....	17
Obtención de Plasma.....	18
Aislamiento de la HDL.....	18
Ultracentrifugación en Gradiente de Densidad.....	18
Electroforesis.....	20
Análisis de Pureza.....	22
Determinación de Proteína.....	22
Análisis de Pureza por Densitometría.....	23
Análisis de Pureza por Inmunoensayo Ligado a Enzima (ELISA).....	24

Caracterización de los Lípidos en Plasma y en la HDL.....	26
Cuidado de la Técnica.....	26
Control de Calidad.....	27
Determinación de Lípidos Totales.....	27
Análisis Cualitativo de las Clases de Lípidos.....	28
Extracción de lípidos totales.....	28
Cromatografía.....	29
Cuantificación de las Clases de Lípidos.....	32
Ácidos grasos libres.....	32
Acilglicérols.....	34
Esteroles.....	35
Fosfolípidos.....	37
Efecto de las Condiciones de Almacenamiento del Plasma sobre el	
Aislamiento de la HDL.....	38
Almacenamiento.....	38
Aislamiento.....	39
Ensayos.....	39
RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
Aislamiento de la HDL.....	40
Ultracentrifugación en Gradiente de Densidad.....	40
Análisis de Pureza de la HDL.....	46
Por densitometría.....	48
Por inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).....	51
Efecto de las Condiciones de Almacenamiento del Plasma sobre el	
Aislamiento de la HDL.....	53
Caracterización de los Lípidos en Plasma y en la HDL.....	58
Control de Calidad.....	58
Lípidos totales.....	58
Clases de lípidos.....	61
Determinación de Lípidos Totales.....	63
Análisis Cualitativo de las Clases de Lípidos.....	68
Cuantificación de las Clases de Lípidos.....	86
CONCLUSIONES.....	96
BIBLIOGRAFIA.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.	Aislamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad de la HDL de <i>Penaeus vannamei</i>41
2.	Monitoreo por electroforesis en gel SDS-PAGE 4-18% de las fracciones producto del aislamiento de la HDL de <i>P. vannamei</i>45
3.	Análisis electroforético de pureza de las fracciones con la HDL de <i>P. vannamei</i> 47
4.	Patrón electroforético de pureza de fracciones con la HDL de <i>P. vannamei</i>49
5.	Análisis electroforético de fracciones obtenidas en el aislamiento de la HDL de <i>P. vannamei</i> de plasma almacenado bajo condiciones de refrigeración y congelación.....54
6.	Patrón de comportamiento de proteína (___) y lípidos (. .) en el aislamiento de HDL de <i>P. vannamei</i> por gradiente de densidad a partir de plasma sometido a dos diferentes condiciones de almacenamiento.....56
7.	Separación de lípidos de plasma de <i>P. vannamei</i> por multidesarrollo en placas de cromatografía de capa fina.....70
8.	Separación de lípidos no-polares de plasma de <i>P. vannamei</i> por CCF, revelado con rodamina B.....71
9.	Separación de lípidos no-polares de plasma de <i>P. vannamei</i> por CCF, revelado con α -ciclodextrina y yodo.....73
10.	Separación de lípidos no-polares de plasma de <i>P. vannamei</i> por CCF, revelado con cloruro férrico.....75
11.	Separación de esteroides por cromatografía de capa fina.....79

Figura	Página
12. Separación de lípidos polares de plasma de <i>P. vannamei</i> por CCF.....	80
13. Identificación de lípidos polares en plasma de <i>P. vannamei</i> machos por CCF en dos dimensiones.....	82
14. Identificación de lípidos polares en plasma de <i>P. vannamei</i> hembras por CCF en dos dimensiones.	83
15. Identificación de lípidos polares con grupos amino en plasma de <i>P. vannamei</i> machos por CCF en dos dimensiones.....	84
16. Identificación de lípidos derivados de colina en plasma de <i>P. vannamei</i> machos por CCF en dos dimensiones.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Fracciones obtenidas durante el aislamiento de la HDL de <i>P. vannamei</i>	43
2.	Análisis comparativo de pureza por densitometria y ELISA en fracción lipoproteica de <i>P. vannamei</i>	50
3.	Concentración proteica en muestras de <i>P. vannamei</i>	52
4.	Análisis comparativo de métodos de cuantificación de lípidos totales en plasma de humanos y de <i>P. vannamei</i>	59
5.	Clases de lípidos en suero humano control "Precinom".....	62
6.	Concentración de proteína y lípidos en muestras de <i>P. vannamei</i>	64
7.	Cuantificación de las clases de lípidos en muestras de <i>P. vannamei</i>	87
8.	Proporción de las clases de lípidos en muestras de <i>P. vannamei</i> tomando como base la concentración de proteína de la muestra.....	89
9.	Composición de los lípidos de HDL aisladas de la hemolinfa de algunos crustáceos.....	90
10.	Análisis comparativo de determinación de lípidos totales por el método colorimétrico y por sumatoria de las clases de lípidos en muestras de <i>P. vannamei</i>	93

RESUMEN

El camarón blanco *Penaeus vannamei* es una de las principales especies que se cultivan en el Centro y Sur de América y es una parte importante de las capturas pesqueras del Pacífico de México. Los lípidos son uno de los nutrimentos más importantes en la alimentación del camarón, y representan una de las principales reservas de energía, sirven como transportadores de vitaminas liposolubles, son precursores de hormonas, componentes de membranas y además algunos de ellos son esenciales para la sobrevivencia de este organismo.

Hasta la fecha, la dirección de las investigaciones sobre lípidos en camarón se ha encaminado hacia el estudio de las lipoproteínas como vehículo de transporte de los lípidos. En el presente estudio se caracterizaron los lípidos que forman parte de la lipoproteína no asociada con el sexo (HDL) en *Penaeus vannamei*.

Para este estudio se utilizó plasma procedente de camarones juveniles blancos cultivados, la HDL se obtuvo por ultracentrifugación en gradiente de densidad con KBr, la concentración de lípidos totales se determinó por un ensayo colorimétrico de acuerdo al método de la sulfofosfovainillina, se identificó a los lípidos por cromatografía de capa fina y se cuantificaron las clases de lípidos por ensayos enzimáticos de reacciones acopladas.

Se encontró que el contenido de lípidos totales en el plasma fue de 2.40% (p/p) y 2.44% (p/p) para hembras y machos, respectivamente. Mientras que en la HDL el porcentaje de lípido, fue de 43.41% en hembras y 32.57% en machos. Cualitativamente los lípidos de plasma presentaron el mismo perfil en machos, en hembras, donde se detectó: diacilglicéridos, insaturados, esteroides libres, fosfoetanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomielina y fosfatidilcolina.

La clase de lípidos dominante tanto en plasma como en la HDL de machos y hembras fue la de los fosfolípidos, aunque también se encontraron acilglicéridos libres y una menor cantidad de ácidos grasos libres. Estos últimos son similares a los que se han reportado para lipoproteínas de transporte en otros crustáceos.

INTRODUCCION

El *subphylum Crustacea*, es el único grupo de ártropodos básicamente acuático. Existen 42.000 especies conocidas de crustáceos, de las cuales el 25% corresponde al orden decápodo, este orden comprende a los camarones, langostinos, cangrejos y langostas entre otros (Barnes, 1989). De todos estos organismos, el camarón es el de mayor importancia comercial. Su producción mundial ha aumentado en las últimas décadas, de las 1.7 millones de toneladas estimadas durante el periodo de los 70's a las 2.5 millones de toneladas en los 80's (Rosenherri, 1991).

Este crustáceo es uno de los recursos pesqueros de más alta plusvalía en el Noroeste de México, mismo que en los últimos años ha tenido un gran auge; donde se han producido hasta 15,233 toneladas en el último ciclo 1994-1995, comparado con 8,967 toneladas del ciclo 1990-1991, de las cuales alrededor de 2,500 toneladas correspondieron a camarón de cultivo (SEMARNAP-Imparcial, 1996).

En el último siglo el camarón que más se comercializaba era el camarón blanco obtenido de los lugares tibios del Golfo de México y de la Costa del Pacífico. A partir de 1980 China y Ecuador empezaron a exportar cantidades extratosféricas de camarón, obtenido en base a la acuicultura (Sea Food LEADER, 1994).

El sucesivo desarrollo de la tecnología acuícola propició que el cultivo del camarón fuera un éxito económico. Se suponía que la camaronicultura sería el negocio más conveniente para todo el mundo, sin embargo, mientras que el crustáceo ciertamente

estaba más disponible de esta manera, el número de países productores y la logística involucrada en el comercio ha hecho el mercado menos predecible y más volátil que antes de que surgiera la acuicultura del camarón (Sea Food LEADER, 1994).

La realidad es que en la actualidad, sólo el 25 al 30% de la producción mundial del camarón es aportada por el cultivo del decápodo, y esto se debe a que su suministro en forma masiva es delicado y la acuicultura no es una ciencia exacta (Sea Food LEADER, 1994).

Los métodos de cultivo han involucrado desde un sistema extensivo tradicional hasta uno intensivo, donde la concentración de animales en lugares pequeños provoca pérdidas por territorialismo, agresión y canibalismo, y los hace más susceptibles a contraer enfermedades (Briggs *et al.*, 1988).

Pese a sus inconvenientes el camarón sigue siendo un organismo valioso comercialmente hablando, por lo que es importante profundizar en los conocimientos científicos, que permitan a mediano y largo plazo optimizar las condiciones de cultivo y la eficiencia en la conversión de alimento a tejido. Para hacer esto es necesario estudiar tanto aspectos nutricionales, como bioquímicos, fisiológicos y patológicos, entre otros.

Los lípidos son uno de los nutrimentos más importantes en la alimentación del camarón, sin embargo los procesos fisiológicos sobre la bioquímica de estos compuestos en el camarón y otros crustáceos, todavía no han sido elucidados. Hasta la fecha, la dirección de las investigaciones se han encaminado hacia el estudio de las lipoproteínas, como vehículo de transporte de los lípidos.

Relativo a esto, Yepiz-Plascencia *et al* (1995) reportaron el aislamiento y caracterización bioquímica de una lipoproteína no asociada con el sexo en el plasma del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Siguiendo esta línea de investigación, en el presente estudio se caracterizó a los lípidos que forman parte de esta lipoproteína, misma que se ha definido como HDL, por ser una lipoproteína cuya densidad es semejante a las lipoproteínas de alta densidad de humanos, y que probablemente sea la responsable del transporte de los lípidos dietarios a través de la hemolinfa del camarón.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Lípidos en la Nutrición y Fisiología del Camarón

Los lípidos son especialmente importantes para los crustáceos, son requeridos para períodos de sobrevivencia, de escasez de alimento y para superar épocas críticas durante estados de su desarrollo embriológico, crecimiento, metamorfosis y maduración (Kattner *et al.*, 1994; Kozlova y Khotimchenko, 1993). La característica que distingue a los lípidos de otros compuestos químicos, es que estos son insolubles en agua, pero solubles en solventes no-polares, tales como hexano, éter etílico o benceno. Las clases principales de lípidos son los ácidos grasos, los acilglicérols, los fosfolípidos y los esteroides.

Los lípidos, juegan varios papeles importantes en la bioquímica, metabolismo y reproducción de los crustáceos. Algunos ácidos grasos son esenciales para su sobrevivencia (Kattner *et al.*, 1994); los acilglicérols, son una fuente importante de energía y la forma predominante de almacén energético (Muriana *et al.*, 1993); y los fosfolípidos al igual que los esteroides realizan importantes funciones como constituyentes esenciales de las membranas celulares (Mourante *et al.*, 1994).

El nivel óptimo de lípidos dietarios en camarón depende de la cantidad y calidad de la proteína proporcionada por la dieta, el nivel de energía disponible y la satisfacción de los requerimientos de ácidos grasos esenciales (Sheen *et al.*, 1994). Los niveles de

lípidos recomendados para alimentos comerciales están en el rango de 6 a 7.5%, dependiendo de la talla del camarón, siendo mayores para las crías pequeñas. Estos niveles no deben de exceder del 10%, ya que disminuye el crecimiento e incrementa la mortalidad de los especímenes (Akiyama y Dominy, 1992).

Ácidos Grasos Esenciales

Existen cuatro ácidos grasos que se han considerado esenciales para el camarón: el linoléico (18:2 ω -6), el linolénico (18:3 ω -3), el eicosapentaenoico (20:5 ω -3) y el docosahexaenoico (22:6 ω -3) (Guary *et al.*, 1976; Bottino *et al.*, 1980; Dall *et al.*, 1993).

En animales con una dieta no deficiente de nutrientes, los ácidos grasos esenciales se asimilan, son oxidados a CO₂, y se distribuyen en los tejidos igual que los no esenciales; de igual forma, son almacenados en el hepatopáncreas, principalmente en la forma de lípidos polares (Dall *et al.*, 1993). Sin embargo, en organismos con deficiencia, los ácidos grasos esenciales dietarios son concentrados en el tejido abdominal y en músculo durante los períodos de movilización de lípidos (Reigh y Stickney, 1989).

Las funciones principales de los ácidos grasos esenciales están relacionadas con su papel como componentes de los fosfolípidos y como precursores de prostaglandinas. Al parecer el papel principal de estos ácidos grasos es que son fuentes para la síntesis de membranas celulares (Dall *et al.*, 1993), ya que se encuentran en una proporción más alta

en la forma de fosfolípidos y como tales son importantes en mantener la flexibilidad y permeabilidad de las membranas biológicas, en el transporte de lípidos, y en la activación de ciertas enzimas (Akiyama y Dominy, 1992).

Penaeus japonicus y *Macrobrachium rosenbergii*, especies marina y de agua dulce, respectivamente, tienen la capacidad de sintetizar ácidos grasos saturados y monoinsaturados de ácido palmítico en el hepatopáncreas, pero estos ácidos grasos no pueden ser transformados en ácido linoleico, ácido linolénico, ácido eicosapentaenoico o ácido docosahexaenoico los cuales son esenciales para el crecimiento del camarón (D'Abramo y Sheen, 1993; Bottino *et al.*, 1980; González-Baró y Pollero, 1993).

Sin embargo, apesar de que las especies de camarón aparentemente no sintetizan *de novo* ácido linoléico o linolénico, estos ácidos pueden ser precursores de otros ácidos grasos ω -6 ya que este organismo es aparentemente capaz de elongar y desaturar de linoleico a 20:2 ω -6 y 20:3 ω -6, y de linolénico a 20:5 ω -3 y 22:6 ω -3 (Reigh y Stickney, 1989).

En la práctica, en dietas de camarón *Penaeus orientalis* conteniendo proteína vegetal, se puede obtener una ganancia óptima de peso y 100% de sobrevivencia en el crustáceo al adicionar un suplemento de 2.16% de ácido linoléico y 0.87% de ácido linolénico a las dietas (Wang *et al.*, 1993). De igual forma para juveniles de *Macrobrachium rosenbergii*, D'Abramo y Sheen (1993) sugieren dietas conteniendo ácido docosahexaenoico y araquidónico en el rango de 0.075% a 0.60%.

Por otra parte, la administración de 1.255% de ácidos grasos altamente insaturados a las dietas de postlarvas de *Penaeus monodon*, permitió que estas resistieran el estrés osmótico y sobrevivieran, pero se observó que niveles del 3.2% no promovían el crecimiento (Rees *et al.*, 1994).

Se sugiere que un exceso en el suplemento de ácidos grasos altamente insaturados w-3 no pueden ser benéficos para el camarón (Akiyama y Dominy 1992). Las recomendaciones para ácidos grasos esenciales como suplemento en la dieta del camarón son de 0.4% para linoléico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico y 0.3% para linolénico (Akiyama y Dominy 1992).

Fosfolípidos

La investigación de los fosfolípidos en crustáceos es de interés porque los fosfolípidos son constituyentes cruciales en el mantenimiento de la estructura e integridad de las membranas celulares (Muriana *et al.*, 1993), y son importantes en la digestión, absorción y transporte de lípidos en la hemolinfa de los crustáceos (Akiyama y Dominy, 1992; Teshima *et al.*, 1986c; Teshima *et al.*, 1986d).

Los fosfolípidos son efectivos para promover el crecimiento del camarón (Alava *et al.*, 1993; Kanazawa *et al.*, 1979), sin embargo este crustáceo tiene una limitada habilidad para biosintetizar fosfolípidos (Teshima *et al.*, 1986b), por lo que la deficiencia de éstos compuestos en la dieta puede resultar en la utilización inefectiva de lípidos dietarios (Teshima y Kanazawa, 1986b y 1986c), lo que reduce significativamente el

peso ganado en la eficiencia de la conversión alimenticia (Calu *et al.*, 1994; Teshima *et al.*, 1986a y Teshima *et al.*, 1986b).

El requerimiento de fosfolípidos varía de especie a especie (Alava *et al.*, 1993). Aunque, en general se utiliza 2% (Akiyama y Dominy, 1992), existen variaciones o diferencias en los reportes. Por ejemplo, si se utiliza fosfatidilcolina pura el requerimiento se reduce al 1% (Akiyama y Dominy, 1992).

Sin embargo, si los fosfolípidos contienen ácido eicosapentaenoico o docosahexaenoico en la posición 2 del fosfolípido, solamente se requieren 0.4% (Akiyama y Dominy, 1992). Por otra parte, Chen (1993), sugirió para *Penaeus monodon* juvenil 1.25% de lecitina de soya.

Además, se ha manejado que un 3% de lecitina comercial en una dieta con 6.5 % de lípidos totales aumenta significativamente la producción del camarón en un 3% en términos de crecimiento, eficiencia alimentaria y producción, o 6% en términos de sobrevivencia (Briggs *et al.*, 1994).

Colesterol

El colesterol es un esteroide típico y es un componente fundamental de las membranas de invertebrados. Este es importante en la formación de nuevo tejido y es un precursor de hormonas esteroideas que son esenciales para el crecimiento, maduración y reproducción (Tsai *et al.*, 1984).

El colesterol de la dieta en los crustáceos es aprovechado totalmente y pasa directamente a incorporarse al cuerpo del animal, metabólicamente es inerte ya que no es

oxidable a compuestos menores como CO_2 , y es incorporado directamente en las membranas celulares (Dall *et al.*, 1993).

El colesterol funciona como un componente de membranas y en la absorción y el transporte de ácidos grasos (Akiyama y Dominy, 1992). Por otro lado, está reconocido que el colesterol promueve el crecimiento en camarón (Chen, 1993; Kanazawa, 1985).

Los crustáceos tales como el camarón son incapaces de sintetizar esteroides *de novo* y por lo tanto requieren esteroides de fuente dietaria (Teshima y Kanazawa, 1971; Teshima y Kanazawa, 1983). El camarón juvenil puede sobrevivir con otros esteroides como ergosterol, estigmasterol y β -sitosterol, 22-dehidrocolesterol, fucosterol y lanosterol, pero su crecimiento es inferior si se compara con el que se observa con colesterol (Teshima y Kanazawa, 1971; Teshima y Kanazawa, 1983; Teshima y Kanazawa, 1986; Young *et al.*, 1992; Dall *et al.*, 1993).

Kanazawa (1985), en *P. japonicus* y Chen (1993) en *P. monodon* juvenil, reportaron que un nivel de 1 y 0.5% de colesterol en la dieta respectivamente, incrementaba el crecimiento de estas especies de camarón. Sin embargo, se ha discutido que para el óptimo crecimiento y sobrevivencia de los crustáceos se necesita de colesterol dietario en proporciones de 0.1-0.2% para larvas de *Penaeus japonicus*, 0.5-1.4% para juveniles de *P. japonicus*, 0.12-0.5% para juveniles de langosta *Homarus sp.*, 0.4-1% para langostino *Pacifastacus leniusculus* y 0.12% en juveniles de *Macrobrachium rosenbergii* (Briggs *et al.*, 1988).

En general se recomienda para camarón un nivel de 0.3-0.5% colesterol en el alimento, con lo que se puede satisfacer su requerimiento nutricional siempre y cuando sea acompañado de fosfolípidos, ya que la adición de estos últimos a las dietas puede mejorar su nivel de sobrevivencia e incrementar el contenido de colesterol de sus músculos (Akiyama y Dominy, 1992; Zhou y Wang, 1992).

Lipoproteínas y Transporte de Lípidos en Crustáceos

Lipoproteínas

Debido a su baja solubilidad en agua, los lípidos requieren un mecanismo de transporte para su translocación en el sistema circulatorio de los animales (Hauerland y Bowers, 1989). La estabilización y transporte de lípidos en la hemolinfa de artrópodos es acompañada por la formación de complejos lípido-proteína, llamados lipoproteínas (Stratakis *et al.*, 1992).

Las lipoproteínas son solubles en agua y su amplio rango de densidad de hidratación permite separarlas con la ultracentrifugación en diferentes clases. Las lipoproteínas en humanos se clasifican en base a su densidad en: muy baja densidad (VLDL < 1.006 g/ml), baja densidad (LDL 1.006-1.06 g/ml), lipoproteínas de alta densidad (HDL 1.06-1.21 g/ml) y lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL > 1.21 g/ml) (Lee y Puppione, 1978; Lee, 1991; Mathews y van Holde, 1990)

En mamíferos, se ha investigado la relación entre las lipoproteínas y las enfermedades cardiovasculares (Komatsu *et al.*, 1993), donde se observan altas

concentraciones de lipoproteínas VLDL y LDL. (Lee, 1991). Por su parte, en crustáceos las lipoproteínas que más abundan son de las categorías de alta densidad (HDL y VHDL) (Komatsu *et al.*, 1993; Lee, 1991; Spaziani y Wang, 1991; Stratakis, 1992).

Las lipoproteínas de alta densidad en crustáceos son diferentes a las lipoproteínas de otros grupos de animales. Los diacilglicérols y fosfolípidos son los lípidos principales de las HDL de insectos, mientras que los fosfolípidos son los lípidos mayoritarios de las HDL de crustáceos (Lee y Puppione, 1988; Komatsu *et al.*, 1993).

Las lipoproteínas de los crustáceos al igual que las de insectos poseen bajos niveles de colesterol del cual poco está esterificado (Spaziani y Wang, 1991); en cambio las HDL de mamíferos son ricas en ésteres de colesterol (Lee y Puppione, 1988; Komatsu *et al.*, 1993).

Las lipoproteínas de mamíferos son complejos esféricos consistentes de un centro de lípidos neutros, usualmente ésteres de colesterol o triacilglicérols, rodeada por una bicapa de colesterol no esterificado, fosfolípidos y varias apolipoproteínas; en la hemolinfa de crustáceos las lipoproteínas no son esféricas, contienen muy pocos lípidos neutros, y consisten principalmente de fosfolípidos y proteínas (Lee y Puppione, 1988).

De acuerdo a la función que desempeñan, existen dos tipos de lipoproteínas en los crustáceos, las relacionadas con la reproducción y las que se encargan del transporte de lípidos (Lee, 1991). Las lipoproteínas reproductivas, se han encontrado sólo en la hemolinfa de las hembras maduras, son llamadas también vitelogeninas, y su función es el traslado de los lípidos del hepatopáncreas hacia el ovario. En cambio, las lipoproteínas

de transporte no se encuentran asociadas al sexo, son comunes a machos y hembras, y probablemente acarrean lípidos del hepatopáncreas a otros tejidos tales como músculo (Lee, 1991).

Transporte de Lípidos

En mamíferos, la mayoría de los lípidos dietarios entran a la linfa después de la absorción del intestino, y entonces los lípidos aparecen en el sistema circulatorio como lipoproteínas (Teshima y Kanazawa, 1980). Los crustáceos tienen un sistema circulatorio de vasos abiertos en contraste con los vertebrados, ésta diferencia puede indicar que el mecanismo de transporte de lípidos sea diferente del de vertebrados (Teshima y Kanazawa, 1980).

En crustáceos, los lípidos neutros de la ingesta son enzimáticamente transformados por esterasas y triacilglicerol lipasas a α,β -diacilglicérols o β -monoacilglicérols, los cuales son convertidos a fosfolípidos por las células absorptivas del hepatopáncreas y transportados a varios tejidos, para usarse como componentes de la membrana o convertidos a lípidos de reserva (Mourente *et al.*, 1994).

En crustáceos, los ácidos grasos dietarios se absorben principalmente en la región del hepatopáncreas y en el rango localizado entre el intestino medio y el intestino posterior (Teshima y Kanazawa, 1979). El hepatopáncreas es el principal órgano procesador y almacenador de lípidos en los crustáceos. se presume que la HDL de transporte es formada en el hepatopáncreas para transportar los lípidos de éste órgano via hemolinfa a los otros tejidos (Mourente *et al.*, 1994).

En un estudio hecho en *P. semisulcatus* se administró palmitato marcado y después de 24 hrs, la totalidad de la radiactividad fué encontrada en el hepatopáncreas como fosfolípidos y triacilglicérolos; además, considerables cantidades de palmitato marcado fueron recuperadas en la fracción de los fosfolípidos de la lipoproteína de transporte en la hemolinfa (Khayat *et al.*, 1994).

Por otro lado, cuando los triacilglicérolos marcados radiactivamente se administraron vía alimentaria a langosta y camarón, los fosfolípidos de la HDL contenían la mayoría de la radiactividad de la hemolinfa (Lee y Puppione, 1978; Teshima y Kanazawa, 1980).

El tipo de célula principal en el hepatopáncreas de crustáceos son las células R, las cuales son células que almacenan numerosas gotitas de lípidos (Lee y Puppione, 1988; Lee, 1991). Estas gotitas están compuestas principalmente de acilglicérolos, mientras que los fosfolípidos son los lípidos mayoritarios en las HDL de crustáceos (Lee, 1991). Se propone que los acilglicérolos en las gotitas de lípidos del hepatopáncreas son convertidos a fosfolípidos y estos son transportados hacia los otros tejidos vía HDL através de la hemolinfa (Lee y Puppione, 1988).

No es conocido donde se forman las HDL de crustáceos. Un sitio probable de ensamble es en las células F del hepatopáncreas, dado que las células F tienen retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi muy extensos (Lee y Puppione, 1988 y Lee, 1991). En vertebrados, las células parenquimales del hígado sintetizan las lipoproteínas del plasma con un ensamble final y secreción por el aparato de Golgi (Lee, 1991).

Lipoproteínas de Transporte en Crustáceos

Los estudios de lipoproteínas son de interés desde diversos puntos de vista, incluyendo la evolución de los medios de transporte de los lípidos en animales, la función de las lipoproteínas en proveer constituyentes lipídicos o apoproteínas para los órganos de utilización, el papel de las lipoproteínas en movilizar lípidos del almacén, control hormonal del metabolismo de lípidos y transporte de lípidos de membrana (Spaziani y Wang, 1991).

La caracterización de los lípidos de las lipoproteínas de transporte en crustáceos son relativamente recientes. En la jaiba *Callinectes sapidus* (Lee y Puppione, 1988), se identificó una lipoproteína de alta densidad llamada LPI con una proporción de proteína y lípidos similar, y en el cangrejo *Cancer antennarius* (Spaziani y Wang, 1991) se han aislado y caracterizado dos lipoproteínas no asociadas con el sexo de la clase HDL.

Por otra parte, en los cangrejos *Eriocheir japonica* y *Charybdis feriata* (Komatsu *et al.*, 1993), así como en el langostino *Pacifastacus leniusculus* (Hall *et al.*, 1995) se detectaron dos lipoproteínas, una de clase HDL y otra de la VHDL, a las cuales se les caracterizó tanto la parte proteica como la lipídica.

Son pocos los estudios que se han realizado sobre las lipoproteínas de transporte en camarón y la caracterización de sus lípidos. En 1980, Teshima y Kanazawa reportaron el aislamiento de tres lipoproteínas en *Penaeus japonicus*, así como la caracterización y cuantificación de los lípidos asociados.

Un estudio más reciente, fué realizado por Komatsu *et al.* (1993) en las especies de camarón *Macrobrachium rosenbergii* y *Penaeus japonicus*, quienes aislaron y caracterizaron dos lipoproteínas no específicas del sexo, una de la clase HDL y la otra VHDL. En este trabajo sólo se determinaron los fosfolípidos y triacilglicérolos asociados.

Por otra parte, en *Penaeus vannamei* Yepiz-Plascencia *et al.* (1995), reportaron el aislamiento y caracterización proteica de una HDL no específica del sexo, para la cual se encontró una densidad de 1.14 g/ml, formada por una apoproteína glicosilada que contiene principalmente manosa, con punto isoelectrico de 5.8 y peso molecular aparente de 98 kDa en geles de electroforesis SDS-PAGE.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar a los lípidos que forman parte del plasma y la HDL plasmática del camarón blanco *Penaeus vannamei* en etapa juvenil, empleando las técnicas de la sulfosfosvainillina, cromatografía de capa fina y ensayos enzimáticos de reacciones acopladas, con el fin de contribuir al conocimiento bioquímico de las lipoproteínas de transporte en crustáceos.

Objetivos Particulares

- Aislar la HDL plasmática del camarón blanco *Penaeus vannamei* de machos y hembras, por ultracentrifugación en gradiente de densidad.
- Determinar los lípidos totales en plasma y en la HDL plasmática del camarón blanco *Penaeus vannamei* de ambos sexos, por la técnica colorimétrica de la sulfosfosvainillina.
- Identificar a los lípidos del plasma del camarón blanco *Penaeus vannamei* de ambos sexos, mediante cromatografía de capa fina.
- Cuantificar ácidos grasos libres, acilglicérols, esterols y fosfolípidos, en el plasma y la HDL plasmática del camarón blanco *Penaeus vannamei* de ambos sexos, utilizando técnicas enzimáticas.

MATERIALES Y METODOS

Muestreo

Se utilizaron camarones blancos cultivados (*Penaeus vannamei* Boone) en estadio juvenil e intermuda, aparentemente sanos, con un peso aproximado de 12 a 14 g, y alimentados con dieta natural, los cuales fueron proporcionados por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur.

Extracción de Hemolinfa

Los animales se sacaron de los estanques de cultivo y se mantuvieron vivos en acuarios de 1000 l de capacidad con aereación constante y temperatura controlada de $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$ y 36 ‰ de salinidad. Posteriormente se sexaron los organismos de acuerdo a su petasma, y se extrajo la hemolinfa siguiendo la metodología descrita por Vargas-Arbores *et al.*, (1993).

Esto se realizó mediante la punción con una jeringa en el primer segmento abdominal localizado en la base de los pleópodos cerca del poro genital. se succionó un volumen de hemolinfa y se recibió en dos volúmenes de solución anticoagulante para camarón (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EDTA, pH 7.3), al que se le adicionaron inhibidores de proteasas (1.5 mg/ml fenilmetilsulfonilfluoruro; 7.5 mg/ml de antipaina; 7.5 mg/ml de pepstatina y 7.5 mg/ml de leupeptina), de acuerdo a

Sotelo-Mundo (1993). Todos los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones fueron de SIGMA (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA).

Obtención de Plasma

La hemolinfa extraída se mezcló con la solución anticoagulante suavemente en la misma jeringa, se pasó a un tubo y fue centrifugada a 3000 r.p.m. (800 x g), durante 5 min a 10°C, en una centrifuga BECKMAN GSR-15 (Beckman Instruments, Inc. Palo Alto CA, USA), para separar las células y obtener el plasma. El plasma así preparado fue transportado en condiciones refrigeradas (5-10°C) al laboratorio del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Una parte de este plasma fue separada para aislar la lipoproteína de alta densidad no asociada con el sexo (HDL), el resto se almacenó inmediatamente a -20°C en alícuotas de 200 µl. El tiempo transcurrido entre la extracción y el almacenamiento y/o procesamiento del plasma no fue mayor de 10 horas.

Aislamiento de la HDL

Ultracentrifugación en Gradiente de Densidad.

A una parte del plasma se le adicionó bromuro de potasio (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), hasta tener una concentración del 44% (p/v) y se procesó por ultracentrifugación en 2 pasos para separar la HDL. Esto se hizo siguiendo la técnica descrita por Yepiz-Plascencia *et al.* (1995), en una ultracentrifuga BECKMAN TLX

(Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA) y utilizando un rotor vertical TLV-100 para el primer gradiente y un rotor casi vertical TLN-100 para el segundo gradiente (ambos de BECKMAN). Esta operación se llevó a cabo con los siguientes parámetros de la corrida: velocidad $400,000 \times g$ (100,000 r.p.m.), temperatura 4°C y tiempo 2 horas.

Para establecer la región donde se encontraba la HDL, se utilizó un tubo control en cada uno de los rotors que se procesaron. Para preparar el control, se incubó la muestra al 44% de KBr con negro de Sudan (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA) por 30 min, en una proporción de 50 μl de negro de Sudan al 10% por cada ml de muestra. Este control se procesó de la misma manera y al mismo tiempo que las muestras para formar el gradiente.

La fracción donde se encontraba la HDL fue obtenida del gradiente utilizando un equipo AUTO DENSITY FLOW II (Labconco Company, Kansas City MO, USA), y se midió la densidad por refractometría óptica utilizando un refractómetro ABBE MARK II REICHERT 10482 (Reichert Scientific Instruments, Buffalo New York, USA), siguiendo la metodología propuesta por Yepiz-Plascencia *et al.* (1995).

Las fracciones del gradiente se dializaron por 1 hora a 4°C contra una solución amortiguadora de fosfatos (10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 y 15 mM NaCl, pH 7.3; preparada con reactivos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), utilizando una membrana de diálisis con límite de exclusión de 12 a 14 kDa, SPECTRA/POR (Spectrum Medical Industries, Inc. Los Angeles, CA, USA).

La fracción se concentró 3 veces en centrífugas AMICON con membrana de retención de 10 kDa (AMICON, Inc, Beverly MA, USA), centrifugando a 2060 x g (4000 r.p.m.) y 4°C en una centrifuga J2-M1 con rotor JA-20.1 (ambos de Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA). Posteriormente se repitió la diálisis por 2 horas más, realizando cambio de la solución amortiguadora después de la primera hora.

Electroforesis

Después de la diálisis, se procedió a realizar un monitoreo de las fracciones por electroforesis, en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970). Para esto, se utilizó un gel discontinuo de gradiente del 4 al 18 % de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS), pH 8.8 y 1.5 mm. de grosor, preparado en un formador de gradiente 10426-A GIBCO-BRL (Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD, USA). El gel se corrió en una cámara vertical GIBCO-BRL V16 (Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD, USA), utilizando una solución cámara (2.5 mM TRIS, 19.2 mM glicina, 0.01 % SDS, pH 8.3). Todos los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones fueron de Sigma Chemical, Co. (Saint Louis MO, USA).

Para el ensayo SDS-PAGE se utilizaron 30 µg de proteína de las muestras de plasma o de las fracciones producto del aislamiento de la lipoproteína, y como marcadores de masa molecular las siguientes proteínas: miosina (200 kDa), β-galactosidasa (116.25 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina (45 kDa), anhidrasa

carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa) y aprotinina (6.5 kDa) de BioRad Laboratories (Hercules CA, USA).

Cada una de las muestras y el estándar con los marcadores de masa molecular se mezclaron con un volumen igual de solución muestra 2X (125 mM TRIS-HCl, 4% SDS, 20 % glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, pH 6.8; preparada con reactivos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), se hirvieron a 100°C por 8 min y se enfriaron en hielo inmediatamente.

Las muestras así tratadas, se cargaron en el gel y se conectó la cámara electroforética a una fuente de poder PS-500-1 SIGMA-ALDRICH TECHWARE (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA - Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee WI, USA). El gel se corrió a corriente constante (20 mA) por aproximadamente 12 horas, o el tiempo suficiente para que el indicador llegara hasta la parte inferior del gel.

Después de la electroforesis, el gel se retiró de la cámara y se tiñó con una solución de anido black al 0.5% en 40% de metanol y 10 % de ácido acético (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), por 1 hora. Luego el gel se destiñó en una solución con ácido acético al 10% y metanol al 40% acético (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), hasta que las bandas de proteína se veían claramente y el fondo del gel estaba transparente.

Después de analizar las bandas producidas por cada una de las fracciones, y verificar visualmente la pureza de la fracción con la EIDL, las muestras se separaron en

alícuotas de 200 μ l y almacenaron a -20°C . El tiempo durante el procesamiento de las fracciones y el almacenamiento en congelación no fué mayor de 4 días, y entre cada uno de los pasos las muestras se mantuvieron bajo condiciones refrigeradas ($5\text{-}10^{\circ}\text{C}$).

Análisis de Pureza

En este ensayo se utilizaron las muestras de plasma y las de la fracción que contenía la HDL de *P. vannamei*. Además fué necesario utilizar una muestra de hemocianina del plasma de este mismo organismo, purificada por la técnica de Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC) y un anticuerpo preparado en conejo contra la banda de 75 kDa de esta proteína, obtenidos y proporcionados por Figueroa-Soto *et al.* (1996).

Determinación de proteína. Se les determinó concentración de proteína utilizando el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985), a las muestras de plasma y HDL de machos y hembras, así como a la de hemocianina. Para esto se hicieron reaccionar 1 ml del reactivo de color para la macrotécnica de BCA (Pierce Chemical Company, Rockford IL, USA) y 50 μ l de muestra que se incubaron a 37°C durante 30 min, para luego medir absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21-D (Milton Roy, Rochester NY, USA).

Todas las muestras se analizaron por triplicado, incluso los estándares con los que se realizó una curva de absorbancia contra concentración, misma que se utilizó para calcular la concentración de las muestras. La curva se realizó utilizando diluciones de un

estándar de albúmina de suero de bovino (BSA) (Pierce Chemical Company, Rockford IL, USA), en buffer salino de fosfatos (PBS) (100 mM NaH_2CO_3 , 100 mM Na_2HCO_3 y 150 mM NaCl, pH 7.3; preparado con reactivos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA).

Análisis de pureza por densitometría. Se utilizó un gel de 4-18% de poliacrilamida con SDS, preparado y corrido en las mismas condiciones que la electroforesis de las fracciones en el aislamiento de la HDL. En particular en este ensayo el análisis electroforético se realizó a las muestras de plasma y HDL de machos y hembras, así como a la de hemocianina; la concentración de proteína aplicada fué de 20 μg para las muestras de plasma, 40 μg para la fracción con la HDL y 5 μg para la hemocianina.

En este caso, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie R al 0.1% en 50% de metanol (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), por toda la noche. Se destiñó en una solución con ácido acético al 10% y metanol al 40% (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), hasta que las bandas de proteína se veían claramente y el fondo del gel estaba transparente. Luego se colocó en un aparato de barrido óptico Mod MSF-300Z SCANNER MICROTEC (Microtec International Inc, Itsinchi, TAIWAN), para capturar la imagen del gel en blanco y negro, en el programa IMAGESTAR (Microtec International, 1990).

Cada una de las muestras produjo un patrón electroforético que fué analizado por separado, con el programa GEL-ES diseñado por Bolaños (1996) Este programa analizó

cada una de las bandas transformando la intensidad de color de la imagen a números los cuales fueron importados a una hoja de cálculo que se trabajó en el programa MICROSOFT EXCEL versión 5.0a (Microsoft Corporation, 1994).

Con los datos de la hoja de cálculo se contruyó una gráfica, en la cual se obtuvieron los picos correspondientes a las bandas del gel. En ésta, los picos representan el ancho y la intensidad de cada uno de las bandas, de tal forma que el área bajo cada uno de ellos, es proporcional a la concentración de la banda producida en el gel.

El área bajo la curva de los picos seleccionados para las bandas de hemocianina de 75 y 82 kDa, los cuales representan el contaminante mayoritario para las muestras de lipoproteína en la fracción lipoproteica se expresó como la proporción relativa del contaminante hemocianina. La cuantificación se llevó a cabo mediante la integración de las áreas de los picos seleccionados en la hoja de cálculo por sumatorias.

En la hoja de cálculo la proporción relativa de hemocianina se obtuvo dividiendo la sumatoria de las áreas de los picos seleccionados entre la sumatoria de todos los picos producidos por la muestra y multiplicado por 100. Después, se determinó la proporción relativa de la lipoproteína en la fracción mediante la substracción de la proporción relativa de hemocianina al 100%.

Análisis de pureza por inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). Las muestras de las fracciones con la HDL se trabajaron en una placa de ELISA de acuerdo a Calderón de la Barca (1994). En un volumen de 100 µl para cada dilución de la muestra en solución

amortiguadora de carbonatos (15 mM Na_2CO_3 , 35 mM NaHCO_3 , pH 9.6; preparada con reactivos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), se colocaron en una microplaca para ELISA (Costar Corporation, Cambridge MA, USA) con concentraciones menores a 1 μg de proteína/pozo, y se dejaron reposar por toda la noche a 4°C, para que la proteína se fijara a la placa.

Las soluciones se vaciaron de la placa y luego se incubó por 30 min a 37°C con una solución bloqueadora preparada con leche descremada en polvo al 1% en buffer salino TBST (20 mM TRIS, 500 mM NaCl, pH 7.5 y Tween-20 0.05%; preparado con reactivos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA). Posteriormente se efectuaron 5 lavados con 200 μl de TBST por pozo, luego se incubó con el anticuerpo anti-75 diluido en TBST, por 2 horas a temperatura ambiente (25-30°C) y con agitación suave.

La solución de anticuerpo se descartó y se realizaron 5 lavados más con TBST. A cada pozo, se le agregaron 100 μl de una dilución en TBST 1:5000 de anti IgG (H+L) de conejo preparado en cabra, conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN, USA) como anticuerpo secundario, y la placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente (25-30°C).

Los pozos se lavaron 5 veces con 200 μl de TBST y posteriormente se efectuaron 2 lavados con 200 μl de agua bidestilada. Después se agregaron 100 μl de solución de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina: GIBCO-BRL (Life Technologies, Inc, Gaithersburg MD, USA). Después de 10 min se detuvo la reacción con 50 μl de una solución 1 M de

ácido sulfúrico, para tomar la lectura de absorbancia de cada uno de los pozos a 450 nm en un lector para microplacas de ELISA Mod. 450 (Bio Rad, Richmond CA, USA).

Durante el inmunoensayo se incluyeron los siguientes controles: a) Pozos con muestras de cada una de las fracciones con la HDL sin anticuerpo primario y b) Pozos con muestras de hemocianina sin anticuerpo primario.

Para la determinación de la concentración de hemocianina en las fracciones se utilizaron diluciones de hemocianina purificada, se realizó el inmunoensayo, y luego se hizo una curva de absorbancia contra concentración. Después con la absorbancia producida en el inmunoensayo con las muestras de las fracciones con la HDL, se determinó la concentración de hemocianina en éstas, así como su proporción.

Todas las muestras de las fracciones, diluciones de hemocianina, así como los controles se realizaron por triplicado. La concentración de proteína correspondiente a la HDL en la fracción analizada, se obtuvo mediante la substracción de la proporción de hemocianina al 100%.

Caracterización de los Lípidos en Plasma y en la HDL

Cuidado de la Técnica

Durante todos los ensayos se trabajó con material nuevo, (tubos, puntas, celdas, jeringas, viales, capilares, etc.) y con protección de las manos con guantes desechables. La cristalería utilizada se lavó perfectamente con detergente enzimático TFRG-A-ZYME (Alconox, Inc, New York NY, USA), se enjuagó varias veces con agua corriente, y por

último con agua destilada, se dejó secar al ambiente, y después se lavó varias veces con una mezcla de cloroformo-metanol 1:1.

Control de Calidad

En las cuantificaciones de lípidos totales y clases de lípidos la concentración de las muestras se determinó por medio de una curva de absorbancia contra concentración, la cual se realizó mediante diluciones preparadas del estándar del lípido de interés de concentración conocida. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado tanto para las muestras como para los estándares.

Además, para estandarizar cada una de las técnicas y como control de los experimentos se utilizó un estándar de suero humano comercial PRECINORM L (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), repitiendo el método tantas veces como fué necesario hasta que se tuvieron resultados de los valores dentro del rango establecido.

Determinación de Lípidos Totales

La concentración de lípidos se determinó por el método colorimétrico de la sulfosfovanilina (Frings y Dunn, 1970). Para esto, 50 µl de las muestras se trataron con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado (Merck-México), se digirieron 10 min en baño de agua hirviendo y se enfriaron en baño de agua (25-30°C).

Una alícuota de este material (40 μ l) se hizo reaccionar con 1 ml de reactivo de color ácido fosfórico-vainillina (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), se mezcló perfectamente, se dejó reposar 30 min a 25-30°C y se midió absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21-D, (Milton Roy, Rochester NY, USA), frente a un blanco de reactivos.

Para determinar la concentración de las muestras se utilizó un estándar de lípidos totales de 10 mg/ml, del cual se hicieron diluciones en etanol absoluto (Merck de México, S.A.). El blanco utilizado para las muestras fué PBS, mientras que para los estándares fué etanol absoluto (Merck de México, S.A.).

Análisis Cualitativo de las Clases de Lípidos

Extracción de lípidos totales. Las muestras de plasma fueron tratadas con una mezcla de cloroformo-metanol para extraer los lípidos, según la técnica de Bligh y Dyer (1959); creando dos fases, según la relación de la mezcla. Para ello, en un embudo de separación se mezclaron 25 ml de cloroformo, 50 ml de metanol y 20 ml de muestra diluída, para tener una proporción de 1:2:0.8, agitando 30 seg después de la adición de cada una de las partes. Posteriormente se le agregaron 25 ml de cloroformo y 25 ml de agua, mezclando 30 seg cada vez, con el fin de tener una proporción de 2:2:1.8. Todos los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones fueron de SIGMA (Sigma Chemical Co. Saint Louis MO, USA).

La mezcla se dejó reposar en la obscuridad, hasta que las capas se separaron (aproximadamente 15 min). La capa inferior con el extracto no-polar se filtró en papel fibra de vidrio AH-284 WHATMAN (Whatman International Ltd, Maidstone, ENGLAND) que contenía sulfato de sodio anhidro (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), y el filtrado se recibió en un matraz bola fondo plano.

Después se hicieron dos extracciones más, con 25 ml de cloroformo (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA) cada una y el extracto se recibió en el mismo matraz bola. La capa clorofórnica se evaporó utilizando un rotavapor 421-1600 LABCONCO (Labconco Corporation, Kansas City MO, USA) a 150 r.p.m., en baño de agua destilada a temperatura ambiente (20-25°C)

El extracto se terminó de secar con nitrógeno gaseoso, se reconstituyó con 1 ml de solución clorofórnica de butilén hidroxitolueno (BHT) (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA) (100 mg/l) y se guardó en un vial ámbar, luego se le burbujó nitrógeno, para almacenar el extracto a -20°C.

Cromatografía. La identificación de los lípidos se realizó empleando placas de vidrio para cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-11.C) 10x10 cm con capa de 200 mm de Silicagel 60 (Aldrich Chemical Company, Inc, Milwaukee WI, USA). Antes de iniciar el desarrollo las placas fueron prelavadas con cloroformo y después activadas a 110°C por 30 min de acuerdo a Henderson y Tocher (1992).

Salvo en los casos indicados, en todas las placas el frente del solvente llegó hasta la altura de 8 cm y aproximadamente 10 µg de lípidos totales de cada uno de los

extractos fueron aplicados tomando 1 cm como referencia (origen) de uno de los extremos, el cual estuvo en contacto con el solvente. (Henderson y Tocher, 1992).

La cámara donde se colocaron las placas fué equilibrada con la mezcla de solventes 30 min antes de iniciar el desarrollo, utilizando papel filtro BLOTTING PAPER VWR 238 (VWR Scientific, Inc, San Francisco CA, USA), para facilitar la saturación (Nelson, 1972). Y las muestras fueron desarrolladas con las siguientes mezclas de solventes:

Lípidos totales. Se desarrolló a la altura de 4 cm del origen, primero con cloroformo-metanol-ácido acético-agua, en proporción 65:25:4:4 v/v/v/v (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), luego a la altura de 7 cm hexano-eter dietílico-ácido acético, en proporción 80:20:1.5 v/v/v (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), y por último toda la placa (8 cm) con hexano-benceno, en proporción 70:30 v/v (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), de acuerdo a Cunningham *et al.* (1994).

Lípidos no-polares. Se desarrolló en toda la placa en hexano-eter etílico-ácido acético, en proporción 80:20:2 v/v/v (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), de acuerdo a Henderson y Tocher (1992).

Lípidos polares. Se hizo primero una separación con acetato de etilo-propan-2-ol-cloroformo-metanol-cloruro de potasio 0.25% en proporción 25:25:25:10:9 v/v/v/v/v (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), de acuerdo a Henderson y Tocher (1992). Después, se procedió a hacer una separación en dos dimensiones, utilizando primero la mezcla de solventes anteriores y para la segunda dimensión cloroformo-metanol-

amoníaco acuoso 7 M, en proporción 65:35:5 v/v/v (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), según Henderson y Tocher (1992).

Los estándares de referencia usados para lípidos neutros fueron: 1-monopalmitoil-rac-glicerol, 1-monoestearoil-rac-glicerol, dipalmitina, diestearina, tripalmitina, triestearina, ácido palmítico, ácido linoleico, colesterol, β -sitosterol y linolenato de colesterol (todos ellos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), mientras que para lípidos polares se usó 1- α -fosfatidilcolina, L- α -fosfatidiletanolamina, L- α -fosfatidil-L-serina, L- α -fosfatidilinositol, 1- α -ácido fosfatídico, L- α -fosfatidil-DL-glicerol, L- α -lisofosfatidilcolina, esfingomielina y cardiolipina (todos ellos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA).

Durante el tiempo de corrida se mantuvo la cámara en un cuarto semioscuro, y después de cada desarrollo las placas, se secaron 5 min al aire en una campana ventilada. Posteriormente se colocaron en un desecador 30 min, al que se le aplicó vacío, para luego revelarse con reactivos específicos (Nelson, 1972).

Para la detección de lípidos en general se usó un revelado con rodamina B (Supelco, Inc. Belenfonte, PA, USA) que se observó en una lámpara de UV a 254 nm, y para distinguir entre lípidos saturados e insaturados se usó α -ciclodextrina y vapores de yodo (Supelco, Inc. Belenfonte, PA, USA). Para esteroides se utilizó una solución preparada con 50 mg de cloruro férrico, 90 ml de agua, 5 ml de ácido sulfúrico y 5 ml de ácido acético (Merck de México) (Henderson y Tocher, 1992). Por otro lado para

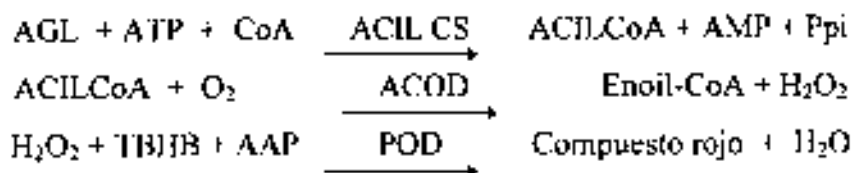
fosfolípidos, se utilizó phospray, ninhidrina en solución, y reactivo de Dragendorff's (Supelco, Inc. Belenfonte, PA, USA) de acuerdo a Henderson y Tocher (1992).

Después de revelar las placas, se calculó el Rf de las manchas dividiendo la distancia recorrida por la sustancia investigada (en cm) entre la distancia del frente del solvente utilizado en cada caso.

Cuantificación de las Clases de Lípidos

Ácidos grasos libres. Para la cuantificación de ácidos grasos libres (AGL) se utilizó el ensayo enzimático comercial HALF MICRO TEST (Boheringer Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), preparado en base a el método de Schimizu *et al.* (1980), y que fué específicamente diseñado para la determinación de ácidos grasos libres en suero o plasma humano.

Esta técnica se basa en el uso de reacciones acopladas, donde la concentración del producto final es estequiometricamente proporcional a la del producto inicial, que en este caso corresponde a la concentración de ácidos grasos libres. La secuencia de las reacciones fué la siguiente:



Donde :

AGL = ácidos grasos libres, ACILCS = acil-coenzima A sintetasa, CoA = coenzima A, ACOD = acil-coenzima A oxidasa, Enoil-CoA = enoil-coenzima A, POD = peroxidasa, TBHB = 2,4,6-tribromo - 3 - hidroxiaácido benzoico. AAP = 4 - aminoantipirina.

Para la determinación de AGL en las muestras, se colocó en una celda SPECTROVETTE (Evergreen Scientific, Los Angeles CA, USA) 1 ml de mezcla de reacción (buffer de fosfato de potasio, pH 7.8, TBHB, $MgCl_2$, ATP, CoA, ACU, CS, POD, ascorbato oxidasa, 4-aminoantipirina y estabilizadores).

A esta mezcla se le agregaron 50 μ l de la muestra, estándar o blanco, se dejó reposar 10 min a 25°C, se le agregaron 50 μ l del reactivo N-etil-maleinimida (para remover el exceso de CoA antes de la oxidación de ácidos grasos activados por la acilCoA oxidasa endógena), se mezclaron en la misma celda y se midió la absorbancia (A_1) a 500 nm, en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21-D, (Milton Roy, Rochester NY, USA).

La reacción se inició agregando 50 μ l de acilCoA oxidasa diluida en un estabilizador, se incubó a 25°C por 15 min y se midió absorbancia de nuevo (A_2). Con estos datos se determinó el valor de AA mediante la siguiente ecuación:

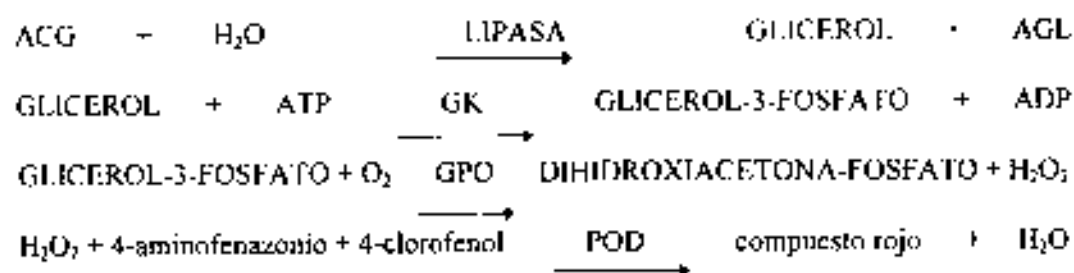
$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{muestra o estándar}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanco}}$$

Este valor sirvió para estimar la concentración de ácidos grasos libres en las muestras. El blanco utilizado en la reacción fue PBS para las muestras y tritón X-100 (50 g/l) para los estándares.

Para el ensayo se utilizó un estándar del ácido graso que se preparó siguiendo el método de Schimizu *et al.* (1980). Se disolvieron 0.25 mmol de ácido linoleico en 500 μ l de etanol absoluto (Merck de México) a 50°C, luego se neutralizó con una solución 1 N de hidróxido de sodio (Sigma Chemical, Co, Saint Louis MO, USA), hasta tener un pH

de 7.0, después se evaporó a sequedad con nitrógeno. El residuo se disolvió en 5 ml de tritón X-100 (50 g/l) (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), para tener una concentración de 50 mM. Durante la preparación del estándar, todo el material utilizado fué protegido de la luz y se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno.

Acilglicérols. Se utilizó el TEST-Combinación TC triglicéridos GPO-PAP (Boehring Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), preparación comercial modificada del método de Wahlefeld (1974). Este método cuantifica glicerol, monoacilglicérols, diacilglicérols o triacilglicérols, indistintamente (Sonnenwirt y Jarett, 1986) y se basa en la secuencia de reacciones mostradas a continuación:



Donde:

ACG - Acilglicérols. GK = Glicerol quinasa, GPO = Glicerol fosfato oxidasa.

POD - Peroxidasa.

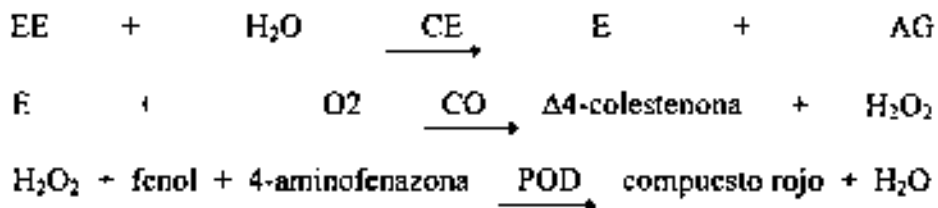
Para la prueba, 10 µl de la muestra, estándar o blanco, se hicieron reaccionar mezclando firmemente, en una celda SPECTROVETTE (Evergreen Scientific, Los Angeles CA, USA) con 1 ml del reactivo TC triglicéridos GPO-PAP (Boehring Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA).

El reactivo contenía 0.15 M de Tris, pH 7.6, 17.5 mM de $MgSO_4$, 10 mM de EDTA, 3.5 mM de 4-clorofenol, 0.15% de colato sódico, 6 mM de ferrocianuro de potasio, 0.12% de éter poliglicólico de alcohol graso, ≥ 2.5 U/ml de glicerol-fosfato oxidasa, ≥ 3 U/ml de lipasa, ≥ 0.2 U/ml de glicerolcinasa y ≥ 0.15 U/ml de peroxidasa.

Después de incubar la mezcla a 25°C por 10 min se midió absorbancia a 500 nm y antes de 60 min, en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21-D (Milton Roy, Rochester NY, USA). La concentración de acilgliceroles totales en la muestra fué calculada utilizando una curva de absorvancia contra concentración, la cual se elaboró utilizando un estándar de glicerol (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA) en agua bidestilada, además también en las pruebas se utilizó un blanco de reactivos que fué agua bidestilada para el estándar y PBS para las muestras.

Esteroles. La determinación se llevó a cabo con la prueba enzimática colorimétrica monotest colesterol CHOD-PAP (Boheringer Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), que utiliza reactivos preparados según el método de Siedel *et al.* (1981). Los reactivos se surten en un liofilizado que se disuelve en agua bidestilada de tal manera que en la solución reactiva se tengan las concentraciones de los siguientes componentes: 100 mM de buffer Tris, pH 7.7, 50 mM de aspartato de magnesio, 1 mM de 4-aminofenazona, 10 mM de colato sódico, 6 mM de fenol, 4 mM de 3,4-diclorofenol, 0.3% de éter poliglicólico de alcohol graso, ≥ 0.4 U/ml de colesterolsterasa, ≥ 0.25 U/ml de colesteroloxidasa y ≥ 0.2 U/ml de peroxidasa.

La prueba se fundamenta en las siguientes reacciones:



Donde:

EE = Esteres de esteroides, CE = Colesterol esterasa, F = Esteroides libres,
 CO = Colesterol oxidasa. POD = Peroxidasa.

Este último compuesto es colorido y su intensidad es proporcional a la concentración de esteroides en la muestra. Las enzimas no son altamente específicas para colesterol, por lo que pueden cuantificar otros esteroides (Sonnenwirt y Jarett, 1986).

Para la determinación, 10 μl de la muestra, estándar o blanco, se mezclaron firmemente con 1 ml de reactivo preparado de Colesterol CHOD-PAP (Boehring Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), en una celda SPECTROVETTE (Evergreen Scientific, Los Angeles CA, USA). La mezcla se incubó durante 10 min a 25°C, e inmediatamente después se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21-D, (Milton Roy, Rochester NY, USA).

La concentración de esteroides totales en la muestra fue calculada utilizando una curva de absorbancia contra concentración, la cual se elaboró empleando diluciones en agua destilada del estándar Cholesterol Calibrator (Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA) a una concentración de 50 mg de colesterol/dl, además en las pruebas se utilizó un blanco de reactivos que fue agua bidestilada para el estándar y PBS para las muestras.

Fosfolípidos. La cuantificación de fosfolípidos se realizó utilizando una modificación del método de Schiefer y Beutler (1985), específico para L- α -Lecitina: En microtubos de polipropileno de 1.5 ml, se mezclaron 500 μ l de solución amortiguadora de boratos (0.29 M de boratos, 11 mM de magnesio, pH 8.0; preparada con reactivos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA) con 500 μ l de muestra, estándar o blanco diluidos en agua bidestilada, los tubos se incubaron a 37°C por 10 min, en baño de agua.

Después, se agregaron 25 μ l de una suspensión con las enzimas fosfolipasa-C y fosfatasa alcalina (0.2 mg/ml y 0.5 mg/ml) (Boheringer Mannheim GmbH, Mannheim, ALEMANIA), preparadas en solución amortiguadora de amonio (sulfato de amonio 3.2 mM, pH 6.0; de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA). Los microtubos se mezclaron e incubaron a 37°C en baño de agua por 20 min. Posteriormente, se inactivaron las enzimas colocando los microtubos en un baño de agua hirviendo a 95-100°C por 5 min y enfriándolos a 20-25 °C.

Después de la hidrólisis de la lecitina, se agregaron a la mezcla 50 μ l de solución de cofactores (5 mM NADH, 15 mM ATP, 7 mM PEP y 56 mM de glucosa; preparada con reactivos de Boheringer Mannheim GmbH, Mannheim, ALEMANIA) y 10 μ l de la mezcla de enzimas piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, ALEMANIA), en una concentración de 3 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente. Todo se mezcló y centrifugó 2 min a velocidad media en una microcentrífuga FISHER Mod. 235 U (Fisher Scientific, Pittsburg PA, USA).

Para la medición de NADH se colocaron en una celda SPECTROVETTE (Evergreen Scientific, Los Angeles CA, USA) 750 μ l del sobrenadante y se midió la absorbancia (A_1) a 340 nm en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21-D (Milton Roy, Rochester NY, USA). Enseguida se le agregaron 25 μ l de la enzima colina cinasa (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), preparada de un liofilizado de 2 U disuelto en 1 ml de agua bidestilada, se incubó 30 min a 25°C, y se midió absorbancia de nuevo (A_2), para calcular ΔA , como sigue:

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{muestra ó estándar}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}}$$

El blanco utilizado fué agua destilada y el estándar se preparó mediante diluciones en agua bidestilada de una solución madre con 1 mg/ml; preparada por disolución de 10 mg de L- α -fosfatidilcolina tipo XVI-E de yema de huevo fresco en 500 μ l de ter-butanol (ambos de Sigma Chemical, Co. Saint Louis MO, USA), aforada a 10 ml con agua bidestilada.

Efecto de las Condiciones de Almacenamiento del Plasma sobre el Aislamiento de la HDL

Almacenamiento

Para este experimento se utilizó plasma de camarón blanco juvenil *P. vannamei* de hembras, obtenido bajo las mismas condiciones expuestas en la parte correspondiente al muestreo. Este plasma fué dividido en 2 partes iguales, una de éstas fué congelada a la

temperatura de -20°C durante 15 hr, y la otra parte se mantuvo el mismo tiempo en condiciones refrigeradas ($5-10^{\circ}\text{C}$).

Aislamiento

Las dos muestras almacenadas bajo condiciones diferentes, fueron procesadas por ultracentrifugación en gradiente de densidad con KBr, siguiendo la metodología señalada anteriormente, únicamente que en este caso sólo se realizó un primer gradiente y utilizó el rotor casi vertical TLN-100, además no fué necesario manejar un tubo control con negro de Sudan, ya que las fracciones fueron colectadas tomando como base aproximadamente 400 μl por fracción.

Ensayos

A cada una de las fracciones obtenidas de los dos almacenamientos, se les midió densidad por refractometría óptica, luego se dializaron y después se les determinó proteína por el método de BCA (Smith *et al.*, 1985), lípidos totales por la técnica de la sulfosfosvainillina (Frings y Dunn, 1970) y se realizó electroforesis en un gel SDS-PAGE 4-18%, donde se cargó plasma y todas las fracciones exceptuando la primera, en concentración de 5 μg /pozo, además de marcadores de masa molecular (2 μg de cada banda de proteína), de acuerdo a la metodología señalada anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento de la HDL

Ultracentrifugación en Gradiente de Densidad

En la obtención de la HDL de plasma de camarón blanco *P. vannamei*, la separación de las fracciones se realizó en cuatro secciones para el primer gradiente y tres para el segundo gradiente, como se muestra en la Figura 1. Para evitar confusiones las fracciones del primer gradiente se señalan con números romanos (I, II, III y IV) y las del segundo gradiente con números arábigos (1,2,3).

En la Fig. 1A, se muestran las fracciones producto del primer gradiente. La fracción I corresponde a la parte superior, abajo de ésta se observó una región amarilla la cual corresponde a la fracción II, de color oscuro en la figura y que es la fracción donde se encuentra la lipoproteína de interés. La fracción III corresponde a la zona clara, que se encuentra abajo de la amarilla y la fracción IV correspondió a la región azul, situada en la parte baja del tubo.

En el proceso de purificación, fué necesario recurrir a un segundo gradiente, por lo que la segunda fracción de cada uno de los tubos procesados se mezcló en una sola, y se agregó más bromuro de potasio hasta tener 44%, para volverse a procesar por ultracentrifugación.

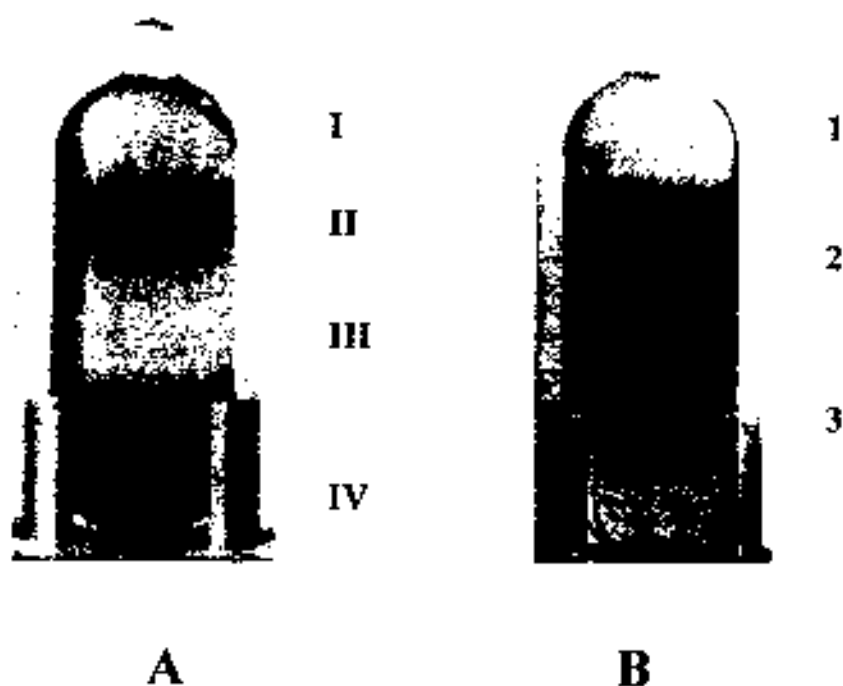


Figura 1. Aislamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad de la HDI de *Penaeus vannamei*. A. Fracciones del primer gradiente. B. Fracciones del segundo gradiente.

En esta ocasión se obtuvieron tres fracciones (Figura 1-B). La fracción 1 por encima de la franja amarilla (oscuro en la figura), la fracción 2 correspondiente a la lipoproteína, de color amarillo claro (en la figura de color oscuro), y la región inferior transparente que corresponde a la fracción 3.

En ambos gradientes, la segunda fracción se nota de un color ligeramente amarillo, para fines de visualización se utilizó un control con el colorante lipofílico de negro de Sudan, que permite observar la banda a simple vista, ya que produce un color oscuro en la región donde se encuentra esta fracción (Mc Don ald y Ribeiro, 1959). Según Yepiz-Plascencia *et al.* (1995), esta región corresponde a la fracción donde se encuentra la lipoproteína de interés y se referirá a esta como fracción lipoproteica.

Las lipoproteínas de artrópodos al igual que las lipoproteínas del plasma de mamíferos son clasificadas de acuerdo a su tamaño, densidad y composición del complejo proteína-lípido (Stratakis *et al.*, 1992). Las densidades de cada una de las fracciones obtenidas en el aislamiento de la HDL en *P. varaminei* se presentan en la Tabla 1.

Para el primer gradiente se tiene que la fracción donde se encuentra la HDL, tiene un valor de 1.1531 g/ml para hembras y 1.1486 g/ml para machos. Ahora bien, en el segundo gradiente la HDL, ya aislada y de mayor pureza tiene una densidad de 1.1345 g/ml para hembras mientras que para machos 1.1352 g/ml. Estos valores de densidad sitúan a la proteína en el rango de 1.12 a 1.21 g/ml, que se reporta en lipoproteínas de alta densidad (HDL₃), tomando en cuenta la clasificación hecha para lipoproteínas de humanos, según Mathews y van Holde (1990).

Tabla 1. Fracciones obtenidas durante el aislamiento de la HDL de *P. vannamei*.

FRACCION	DENSIDAD		PROTEINA		VOLUMEN		PROTEINA		% PROTEINA	
	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS
	(g/ml)		(mg/ml)		(ml)		mg/fracción		en fracción	
1ER GRAD										
I	1.1377	1.1345	0.2616	0.2527	8.2	5.3	2.1451	1.3393	0.36	0.23
II	1.1531	1.1486	0.5629	0.6186	15.4	16.6	8.6687	10.269	1.45	1.78
III	1.1889	1.1864	0.9798	1.0258	26.3	28.0	25.768	28.722	4.30	4.99
IV	1.2786	1.2921	39.43	46.610	13.6	11.5	536.25	536.01	93.89	93.00
2DO GRAD										
1	1.1025	1.1038	0.0480	0.1442	4.0	4.7	0.1920	0.6777	3.71	12.17
2	1.1345	1.1352	0.6796	0.8790	4.6	4.4	3.1262	3.8676	60.50	73.19
3	1.1794	1.1710	0.1321	0.0547	14.0	13.5	1.8494	0.7385	35.79	6.95

La mayor parte de los trabajos que se han desarrollado en crustáceos han demostrado que los lípidos de la hemolinfa se encuentran asociados casi totalmente con lipoproteínas de la clase de lipoproteínas de alta densidad HDL. (Lee y Puppione, 1988). En *P. vannamei*, sólo una banda se visualiza en los tubos con el colorante específico para lípidos de negro de Sudan y ésta corresponde al rango de 1.12-1.19 g/ml en machos y 1.15 a 1.19 g/ml en hembras (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995).

En la Figura 2, se muestra una fotografía de un gel, en el que se cargaron las fracciones obtenidas en los dos gradientes y plasma en muestras de *P. vannamei* en una concentración de proteína de 30 µg por carril. En los carriles 9 y 18 se observa el plasma, en donde abundan 3 bandas, una alrededor de 200 kDa y más abajo dos bandas de 82 y 75 kDa, características de hemocianina (Hc), proteína más abundante en el plasma de los crustáceos (Figueroa-Soto *et al.*, 1996).

Los carriles del 2 al 5 para machos y 11 al 15 para hembras muestran las fracciones producto del aislamiento de la HDL del primer gradiente. En la fracción I (carriles 2 y 11), se alcanza a percibir un poco de HDL en forma de agregados en la parte superior, y hay gran contaminación de hemocianina.

En los carriles 3 y 12 se muestra la fracción lipoproteica, observándose una banda difusa en medio de los estándares de 97 y 116 kDa, y dos bandas más abundantes en la parte superior por encima de 200 kDa, característico de la HDL de formar dímeros y trimeros (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995). En la tercera fracción (carriles 4 y 13) abunda una banda bien definida alrededor de 200 kDa y dos bandas más abajo características de

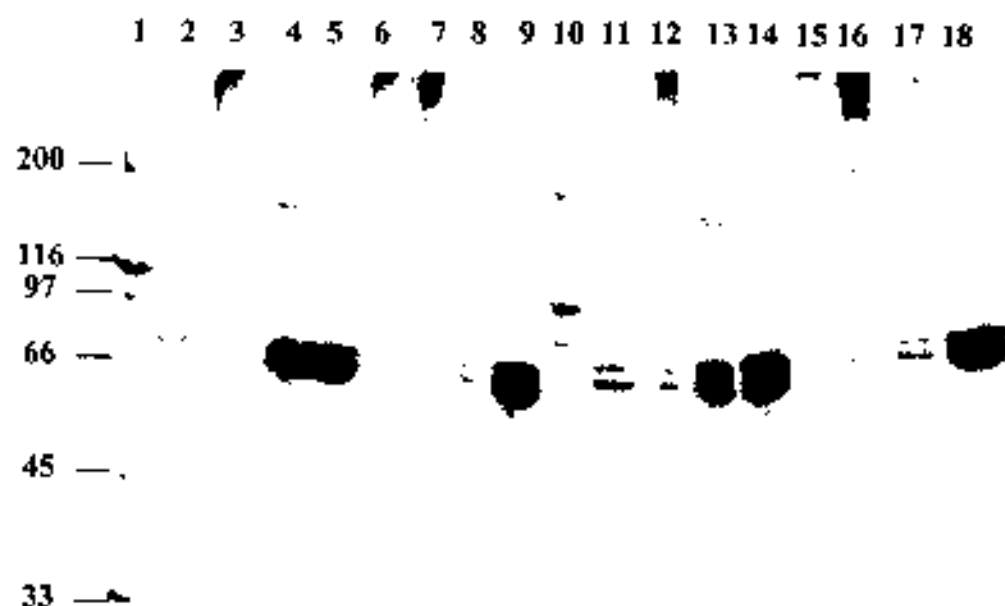


Figura 2. Monitoreo por electroforesis en gel SDS-PAGE 4-18 %, de las fracciones producto del aislamiento de la HDL de *P. vannamei*. Carriles 1 y 10, estándares de masa molecular; carril 9, plasma de machos; carriles 2-5, fracciones del primer gradiente de machos; carriles 6-8, fracciones del segundo gradiente de machos; carril 18, plasma de hembras; carriles 11-14, fracciones del primer gradiente de hembras; carriles 15-17, fracciones del segundo gradiente de hembras.

hemocianina, lo mismo se observa en la fracción IV (carriles 5 y 14), pero Hc es más abundante.

En los carriles 6 al 8 y 15 al 17, se encuentran las fracciones producto de la purificación de la HDL del segundo gradiente. En la fracción 1 (carriles 6 y 15), se observan bandas características de la HDL, según los datos de la Tabla 1, la concentración de proteína que aporta esta fracción es demasiado baja con respecto a la fracción 2 (carriles 7 y 16). Por otra parte, en los carriles 7 y 18 se observa la fracción 3, de densidad mayor (1.17 g/ml), con restos de bandas características de la HDL, pero con una gran proporción de hemocianina como contaminante.

La HDL aislada se observa en los carriles 3 y 12 para las fracciones del primer gradiente y 7 y 16 para el segundo gradiente. Al comparar estas fracciones se nota gran diferencia en cuanto a la pureza de las muestras, ya que en las fracciones del primer gradiente las bandas características de Hc, son más abundantes que en las del segundo gradiente, tomando en cuenta que en los carriles se cargó la misma concentración de proteína.

Análisis de Pureza de la HDL

Para cuantificar la HDL y su grado de pureza en la fracción lipoproteica del segundo gradiente se utilizó densitometría e inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). En la Figura 3, se pueden apreciar las muestras de plasma (carriles 2 y 4), fracciones lipoproteicas (3 y 5) y hemocianina purificada (carril 6) utilizadas para medir la



Figura 3. Análisis electrofóretico de pureza de las fracciones con la HDL de *P. vannamei*. Gel SDS-PAGE 4-18%. St, estándares de masa molecular, carril 1, plasma de hembras; carril 2, fracción con la HDL de hembras; carril 3, plasma de machos; carril 4, fracción con la HDL de machos; carril 5, hemocianina.

proporción de ésta en las muestras de las fracciones y por lo tanto, la correspondiente a la HDL aislada

Por densitometría. Como ya se había mencionado, para evaluar la proporción de Hc por esta técnica, se hizo un barrido óptico del gel con las muestras de HDL (Fig. 3). En la Figura 4, se presenta el esquema que se siguió para estimar esta proporción relativa, donde los picos de la gráfica representan cada una de las bandas que se muestran en el recorte del gel.

En la figura y de derecha a izquierda, en A arriba de 200 kDa, se observan dos bandas difusas que llegan a pegarse (probablemente un trímero y un tetramero de la banda de 98 kDa); luego en B, una banda difusa abajo de 200 kDa (probablemente un dímero de la HDL); la banda característica de la HDL (C) de 98 kDa, y enseguida en D, las bandas de 82 y 75 kDa características de Hc.

Por último en E, abajo de 66 kDa se aprecia una banda muy pequeña que apenas se alcanza a distinguir. Según experimentos con anticuerpos anti-HDL, en Western Blot (Dra. Gloria Yepiz Plascencia y Q. Monica García Bolaños, comunicación personal), esta banda corresponde también a la HDL, y es producto de la degradación de la proteína.

Con estas gráficas y mediante sumatorias se determinó la proporción relativa de Hc, la suma total y por diferencia, la proporción correspondiente a la HDL. Los resultados son presentados en la Tabla 2, en donde se observa una mayor proporción de

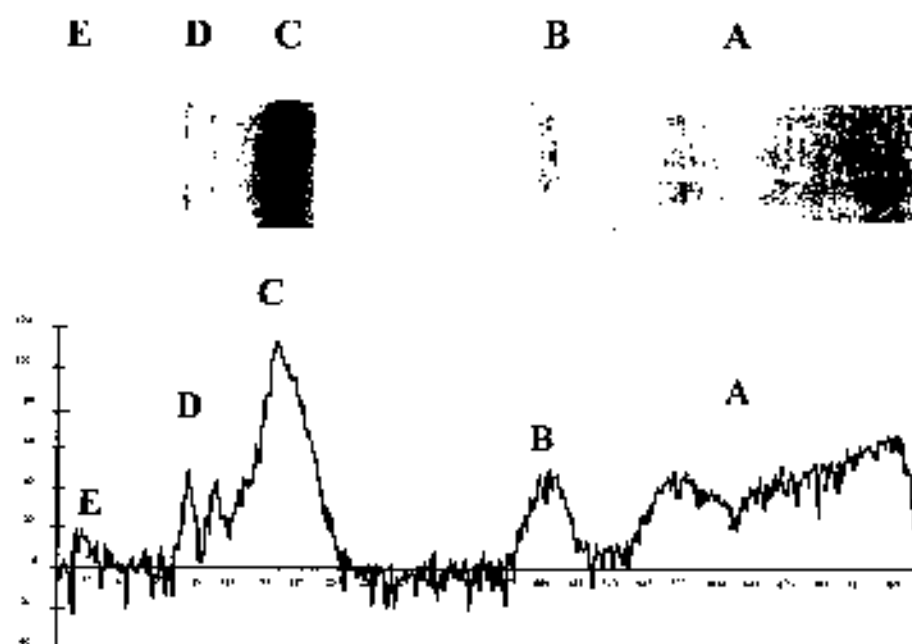


Figura 4. Patrón electroforético de pureza de fracciones con la HDL de *P. vannamei*. A. Tetramero-trímero. B. Dímero. C. Monómero. D. Hemocianina. E. Producto de la degradación de la HDL.

Tabla 2. Análisis comparativo de pureza por densitometría y ELISA en fracción lipoproteica de *P. vannamei*.

PROPORCION	DENSITOMETRIA		ELISA	
	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS
Hc (%)	4.72	2.04	4.88	0.20
HDL (%)	95.28	97.96	95.12	99.80

Hc = Hemocianina, HDL = Lipoproteína plasmática de alta densidad no asociada con el sexo

hemocianina en la fracción de la HDL de hembras, y esto únicamente se debe al manejo de la muestra y a la habilidad que se tiene al procesarla, específicamente en el paso del fraccionamiento.

Por inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).

En la Tabla 2 se reportan los resultados que se obtuvieron al cuantificar Hc por ELISA. Al comparar estos resultados con los obtenidos por densitometría (en la misma tabla), se observa que son similares en cuanto a la fracción de hembras, sin embargo la proporción en machos es diferente.

Debido a que la concentración de hemocianina en machos es tan pequeña, tal vez el método de densitometría sobreestima la proporción de Hc, ya que sólo es una cuantificación visual que depende de la resolución de la imagen que se obtenga del gel; en cambio la cuantificación por ELISA es más sensible y logra detectar cantidades muy pequeñas en una muestra.

La técnica de medir proteína indirectamente por ELISA es muy popular por lo práctico, específico y exacto de sus mediciones, precisamente cuando se tienen muestras de proteínas en una mezcla y es difícil determinar su proporción, un ensayo similar fue realizado en *Manduca sexta* para estimar la concentración de LTP (partículas de transferencia de lípidos) en la hemolinfa de estos insectos (Van Heusden et al., 1996).

Con los resultados obtenidos por ELISA se estimó la concentración de la HDL en la fracción lipoproteica, la cual es reportada en la Tabla 3 junto con las determinaciones de proteína en plasma tanto para hembras como para machos. Estos valores de proteína,

Tabla 3. Concentración proteica en muestras de *P. vannamei*.

MUESTRA	PROTEÍNA (mg/ml)	
	HEMBRAS	MACHOS
PLASMA ¹	96.0567±1.2108	102.0471±0.9009
FRACCION LIPOPROTEICA ¹	1.9539±0.0204	1.9339±0.0062
HDL ²	1.8585	1.9300

¹ Media y desviación estándar de tres repeticiones.

² Lipoproteína plasmática de alta densidad no asociada con el sexo corrigida por ELISA.

son los que se consideraran en las tablas de las cuantificaciones de lípidos totales y clases de lípidos, que se mencionan más adelante.

Efecto de las Condiciones de Almacenamiento del Plasma sobre el Aislamiento de la HDL

Las lipoproteínas de humanos son frágiles y no toleran el congelamiento, liofilización o almacenamiento por largos períodos en soluciones; ya que se alteran sus características electroforéticas, de densidad y de precipitación con polianiones; por lo que el análisis de lipoproteínas de plasma humano, debe realizarse con muestras frescas (Bachorick, 1982).

En el caso de crustáceos la disponibilidad de muestras de plasma para estudio de lipoproteínas es más limitante, lo que dificulta su manejo en el laboratorio. En vista de este problema, se optó por comparar el aislamiento de la HDL de *P. vannamei* almacenando el plasma bajo dos condiciones, la de refrigeración y la de congelación.

En el aislamiento de la HDL de las muestras procedentes del almacenamiento bajo condiciones de refrigeración y congelación, se obtuvieron 10 fracciones con densidad ascendente y producto de un sólo gradiente. En la Figura 5, se muestra una fotografía de un gel SDS-PAGE 4-18% con las fracciones de ambos tratamientos. En las fracciones procedentes del plasma que se almacenó en refrigeración la HDL se distribuyó en las fracciones 2 a la 5, concentrándose en la 2, mientras que en las fracciones en las que el plasma se almacenó bajo congelación la HDL se distribuyó en las fracciones 2 a la 6 concentrándose en la 3.

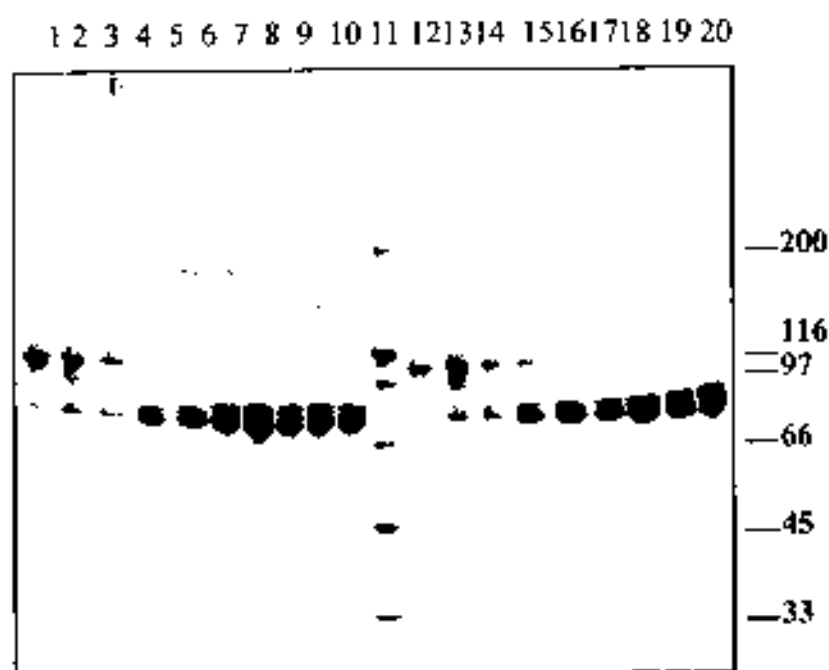
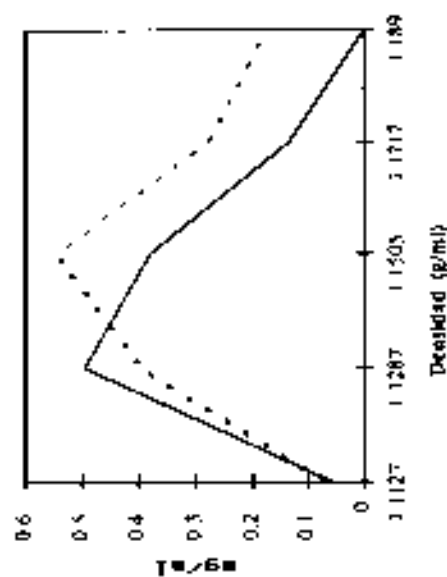


Figura 5. Análisis electroforético de fracciones obtenidas en el aislamiento de la HDL de *P. vanuamei* de plasma almacenado bajo condiciones de refrigeración y congelación. Carriles 1-9, fracciones procedentes de plasma refrigerado; carril 10, plasma; carril 11, estándares de masa molecular; carriles 12-20, fracciones procedentes de plasma congelado.

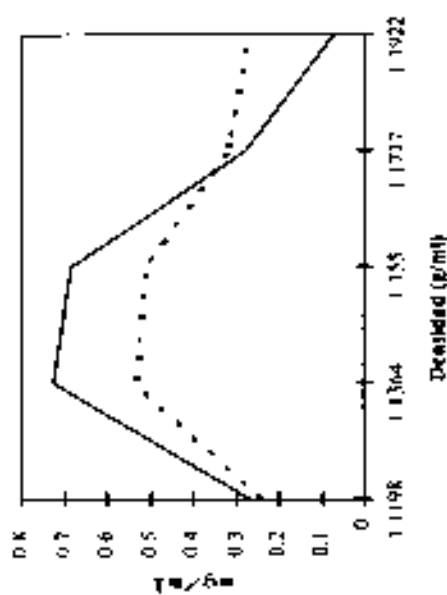
Por otra parte, en la Figura 6 se presenta una gráfica de la distribución de las fracciones en el gradiente de densidad, utilizando los ensayos de proteína y lípidos, para ambas condiciones de almacenamiento. En la gráfica 6A, se observa el patrón obtenido con las muestras del almacenamiento refrigerado y en 6B, el patrón obtenido con las muestras del almacenamiento congelado. En ellas se observa que en el panel A, existen picos máximos definidos en proteína y lípidos, mientras que en B se presenta una distribución más homogénea, donde la HDL se redistribuye dispersándose en el gradiente.

Según Yepiz-Plascencia *et al.* (1995), el rango de densidades de la distribución de la HDL de *P. vannamei*, es de 1.12 a 1.19 g/ml, en este caso, en las muestras procedentes tanto de plasma refrigerado como congelado, la distribución de la HDL en el gel de electroforesis y en las gráficas se encuentra en este rango de densidades, mismo que corresponde a la clase de HDL₃, dentro de la clasificación hecha para humanos (Mathews y van Holde, 1996).

Sin embargo, aunque las muestras se distribuyen alrededor de la zona que se reporta para *P. vannamei* (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995), la distribución que se obtiene del gradiente en la muestra que se congeló es diferente al patrón que se observa en la muestra refrigerada, la cual es muy similar al patrón que se ha reportado (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995).



B



A

Figura 6. Patrón de comportamiento de proteína (—) y lípidos (.....) en el aislamiento de la LIDI. de *P. vannamei* por gradiente de densidad a partir de plasma sometido a dos diferentes condiciones de almacenamiento, refrigerado (A) y congelado (B).

En un estudio similar realizado en trucha *Oncorhynchus mykiss*, el perfil lipoproteico de muestras congeladas resultó en una leve redistribución de las clases de lipoproteínas de acuerdo a la densidad, produciéndose un decremento en el pico máximo de HDL, y la aparición de otro entre HDL y LDL (Wallaert y Babin, 1995).

Tal vez, los resultados que se tuvieron en *P. vannamei* son un reflejo de esta redistribución, precisamente por la proporción tan alta que tiene de HDL, ya que en trucha se ha atribuido esta redistribución a agregaciones de las lipoproteínas, que son estimuladas por las altas concentraciones de HDL. (Wallaert y Babin, 1995).

Con estos resultados se puede sugerir que el tipo de análisis a realizar con las HDL dictará el tipo de almacenamiento a utilizar. Cuando los fines sean cuantitativos, de establecer un perfil lipoproteico en las muestras de plasma o se requiera caracterizar por separado las diferentes moléculas de HDL, será necesario almacenar el plasma en refrigeración y minimizar el tiempo de almacenamiento entre la obtención del plasma y la obtención de la HDL.

En los casos donde los análisis incluyan las diferentes moléculas de HDL y se pretenda analizar principalmente la apolipoproteína, probablemente el congelamiento podría ser utilizado como almacenamiento. El efecto de tiempo de almacenamiento no fué estudiado en este caso y serán necesarios estudios mas profundos en un futuro para investigar este punto.

Caracterización de los Lípidos en Plasma y en la HDL.

Control de Calidad

Lípidos totales. La cuantificación de lípidos totales se realizó con la técnica de la sulfofosfovainilina (SPV), la cual se estandarizó inicialmente con suero humano, para el cual la técnica fué diseñada, el valor que se obtuvo fué de 4.8505 mg/ml que se encuentra en el rango esperado de 4 a 10 mg/ml (Krupp, 1986).

En experimentos preliminares se utilizaron métodos gravimétricos, como el de Bligh y Dyer (1959) y el de Hara y Radin (1978), donde en plasma humano y plasma de camarón blanco, se obtuvo una desviación estándar muy amplia (Tabla 4), comparada con la de la técnica colorimétrica. Estos resultados probablemente se deban a que estos métodos gravimétricos han sido diseñados para tejido.

El manejo y análisis cuantitativo de los lípidos por el método gravimétrico, plantea algunos problemas que no se presentan en el análisis de otros tipos de sustancias (Tietz, 1972). El método gravimétrico tiene tres pasos: extracción de lípidos por medio de solventes, secado del extracto a temperaturas adecuadas y pesada analítica del residuo (lípidos) (Sonnenwirth y Jarett, 1986).

El riesgo al que se ven sujetas las muestras de lípidos al aplicar estos pasos implica la autoxidación, ya que algunos lípidos son lábiles a la luz, las temperaturas altas y al oxígeno. Al emplear el método gravimétrico se requieren solventes volátiles e inflamables y ello representa un riesgo constante, además, tienen presión de vapor alta y

Tabla 4. Análisis comparativo de métodos de cuantificación de lípidos totales en plasma de humanos y de *P. vannamei*.

MUESTRA	METODOS		
	BLIGH Y DYER (1959)	HARA Y RADIN (1978)	COLORIMETRICO
Plasma humano	12.26±3.58	13.60±1.74	5.81±0.0
<i>P. vannamei</i>	H	11.20±0.80	ND
	M	9.60±1.60	ND

ND = No determinado.

baja tensión superficial por lo que se necesita de una técnica especial para medirlos, en especial si la temperatura ambiente es superior a 20 °C (Tietz, 1972).

Por otra parte, las mezclas de solventes utilizadas para determinar lípidos por el método gravimétrico, también extraen cantidades significativas de sustancias no lipídicas como urea, glucosa, glutatión, ácido úrico, creatinina y sales inorgánicas (Sonnenwirth y Jarett, 1986).

Estas desventajas se multiplican al trabajar con muestras muy pequeñas, por lo que los errores aumentan todavía más, como es el caso de las muestras de *P. vannamei* en este estudio, en el que se contaba sólo con 50 µl para trabajar. En el presente ensayo, al emplear este método se necesitaba de una alta cantidad de lípidos, por lo menos 1 mg (Dr. Rolf Ziegler, comunicación personal), y para tener esta cantidad en las muestras de *P. vannamei* se necesitaban cerca de 1 ml mientras que con la técnica colorimétrica se utilizaron únicamente 50 µl, correspondiente a 200 veces menos la cantidad de muestra.

En 1972, Tietz afirmaba que apesar de estas desventajas, el método más directo y merecedor de confianza para la determinación del total de lípidos en suero era el método gravimétrico. Sin embargo, el método de la SPV es más rápido, da una estimación del valor de los lípidos totales, utiliza muy poco equipo, y es muy práctico para evaluaciones con fines de diagnóstico en campo, además las técnicas colorimétricas son las más populares porque pueden semiautomatizarse para el procesamiento de un gran número de muestras (Sonnenwirth y Jarett, 1986).

Clases de lípidos. En la cuantificación de las clases de lípidos se emplearon técnicas enzimáticas. Las ventajas principales de los métodos enzimáticos consisten en que se elimina el uso de reactivos severos, como los requeridos en la determinación química y evita las interferencias de otros constituyentes plasmáticos debido a la especificidad de las enzimas (Krupp, et al., 1986).

Para estandarizar estas técnicas, se recurrió a utilizar un suero humano comercial "Precinorm" (Boehringer Mannheim GMBH, Mannheim, ALEMANIA), este suero se utiliza como control de calidad en los laboratorios clínicos donde se manejan estas técnicas en forma rutinaria. Los resultados obtenidos con estas técnicas de cuantificación se presentan en la Tabla 5.

Para el caso de ácidos grasos libres, esteroides y fosfolípidos el valor en las tablas se encuentra expresado como el compuesto que se utilizó como estándar, en el caso de acilglicérols para fines de cálculo en "Precinorm" se usó trioleína, ya que es el acilglicérol más abundante entre los lípidos séricos de humanos (Sonnenwirth y Jarett, 1986).

Los valores que se obtuvieron en cada una de las clases de lípidos para el control "Precinorm", se situaron dentro del rango estimado por el Centro de Estandarización de Boehringer Mannheim, lo que aseguró que se tenía un buen manejo de la técnica, necesario para poder trabajar con las muestras de *P. vannamei*.

Tabla 5. Clases de lípidos en suero humano control "Precinorm".

VALOR	AGL (Lícoléico) mg/ml	ACG (Tróleina) mg/ml	ESTEROLES (Colesterol) mg/ml	FOSFOLÍPIDOS (Lecitina) mg/ml	Σ LIP TOT mg/ml
Obtenido ¹	0.1687±0.0009	1.3489±0.0186	1.9286±0.1017	1.7044±0.0696	5.1506
Esperado ²	0.028-0.168	1.177-1.806	1.50-2.16	1.34-2.01	4.045-6.144

AGL = Ácidos grasos libres y ACG = Acilglicérols

¹ Media y desviación estándar de tres repeticiones.

² Valor de referencia para este suero reportado según el Centro de Estandarización de Kochringger Mannheim

Determinación de Lípidos totales

Debido a las ventajas que ofrecía la técnica de la SPV y por las condiciones que se tenían de trabajo, así como de disponibilidad en la cantidad de muestra, se eligió esta técnica para cuantificar los lípidos totales en el plasma y la HDL de *P. vannamei*, los cuales se presentan en la Tabla 6.

Los valores de lípidos obtenidos para plasma son muy similares en ambos sexos, en cambio al observar los de la HDL se nota un valor mayor en hembras que en machos. Tomando en cuenta la concentración de proteína de la muestra, se puede notar una diferencia amplia entre la proteína y lípidos en plasma, mientras que en la HDL, la relación de proteína y lípidos es superior a 0.4. Si se observa el porcentaje se nota que los lípidos representan tan sólo el 2.4% en plasma, mientras que en la HDL oscilan de un 32.87% en machos a un 43.41% en hembras.

El plasma de invertebrados marinos es usualmente bajo en lípidos (Lee, 1991). Los resultados que se reportan en este ensayo son comparables a los que se han reportado en la hemolinfa del camarón *Penaeus japonicus* de 2.5 mg/ml (Lee, 1991) y hasta un rango de 3 a 8 mg/ml (Vazquez-Boucard *et al.*, 1989).

Al comparar los valores de la lipoproteína con las HDL de otras especies de camarón, se tienen relaciones de proteína a lípidos superiores a las que se obtuvieron en camarón blanco. En la HDL de *P. japonicus* se reportó una relación de proteína a lípido de 1:1.32 (Teshima y Kanazawa, 1980) y 1:1.080 (Komatsu *et al.*, 1993); mientras que en *Macrobrachium rosenbergii* se reportaron 1:2.728 (Komatsu *et al.*, 1993).

Tabla 6. Concentración de proteína y lípidos en muestras de *P. vannamei*.

MUESTRA	PROTEINA (mg/ml)	LÍPIDOS (mg/ml) ^a	P : L	L + P (mg/ml)	%L	
PLASMA	H	96.0567±1.2108 ^a	2.3646±0.1173	1.0.02462	98.4222	2.40
	M	102.0471±0.9009 ^a	2.5527±0.1170	1:0.02501	104.6010	2.44
HDL	H	1.8585 ^b	1.4250±0.1312	1:0.7671 ^b	3.2841 ^b	43.41 ^b
	M	1.9500 ^b	0.9448±0.0643	1:0.4898 ^b	2.8753 ^b	32.87 ^b

^a Media y desviación estándar de tres repeticiones.^b Datos basados en HDL, corregida por ELISA.

En otras especies de crustáceos se han reportado valores más bajos. Partes iguales de proteína y lípidos en la jaiba *Callinectes sapidus* (Lee y Puppione, 1988), mientras que en el cangrejo *Eriocheir japonica* se tiene 1 parte de proteína por 0.679 partes de lípidos y en el cangrejo *Charybdis feriata* 1 parte de proteína por 0.893 partes de lípidos (Komatsu *et al.*, 1993).

Tomando en cuenta la molécula de la lipoproteína, los lípidos en *P. vannamei* representaron el 43.41% en hembras y 32.87% en machos, mientras que en el cangrejo *Cancer antennarius* se reportó 30.7% (Spaziani y Wang, 1991) y en el langostino *Pacifastacus leniusculus* 47.6% (Hall *et al.*, 1995).

Esta discrepancia en los valores puede deberse a la técnica utilizada durante la cuantificación, a variaciones entre especies, variaciones provocadas por el clima, el estadio del animal, la temperatura, e incluso se han reportado variaciones relacionadas con la hora del día en que se colecta la hemolinfa del animal (Vazquez-Boucard *et al.*, 1989).

Los valores de lípidos totales obtenidos en HHD de *P. vannamei* son más altos en hembras que en machos. Esto podría ser debido a que en la HHD la relación de proteína a lípidos no es tan marcada y una diferencia en muestras puede notarse más claramente que en el plasma, donde la diferencia es mínima, e incluso el valor de machos es mayor que el de hembras, la cual puede deberse a diferencias propias entre animales.

Eliminando el efecto de vitelogénesis, las diferencias en los valores también pueden deberse a que la proporción de los lípidos que se asocian a la HDL no es la misma para un sexo que para el otro, o quizá a la influencia de otras proteínas que se unen a lípidos. En experimentos preliminares se encontraron lípidos en las otras fracciones del primer gradiente de *P. vannamei*, atribuidos tal vez a restos de HDL o quizá a la presencia de otras proteínas que se asocian a lípidos, o que en el plasma se encuentran lípidos libres.

En camarón macho y hembra, se encontró que la mayoría de los lípidos séricos estaban asociados a lipoproteínas de la clase HDL y VHDL, pero raramente con LDL. (Teshima y Kanazawa, 1980). También se ha reportado la presencia de lipoproteínas de la clase HDL₂ en *Cancer antennarius* (Spaziani, 1988). Komatsu *et al.* (1993), reportaron una VHDL en *Macrobrachium rosenbergii*, *Penaeus japonicus*, *Charybdis feriata* y *Eriocheir japonica*, con un contenido de lípidos bajo, en un rango de 0.033-0.291 partes de lípidos contra 1 parte de proteína.

Recientemente se ha reportado la presencia de lípidos en una lipoproteína de muy alta densidad en langostino la cual contiene 11.4% de lípidos totales, esta es una proteína con una densidad de 1.275 g/ml que en condiciones reductoras presenta subunidades de 210 kDa (Hall *et al.*, 1995).

Si se observa con atención la Figura 2, en donde se monitoreó el proceso de aislamiento de la HDL de *P. vannamei*, se puede notar que probablemente esta proteína se localice en la fracción III del primer gradiente y por el patrón que presenta se puede

observar también en las muestras de plasma. Esto parece indicar que la VHDL es más abundante que la HDL por lo que su contribución con los lípidos en el plasma debe ser considerable.

Según Hall *et al.* (1995), la VHDL aislada en langostino representa el 5% de la proteína total del plasma, contribuyendo con el 53% de los lípidos del plasma, mientras que la HDL representa tan sólo el 0.4% y contribuye con sólo el 30% de los lípidos del plasma.

Por otro lado, se ha reportado en algunos invertebrados que hemocianina también se une a lípidos. Pollero *et al.* (1992), mencionaron una probable interacción de hemocianina y lípidos en el caracol *Ampullaria canaliculata*. Además, el papel de la hemocianina en el transporte de lípidos ha sido demostrado en cefalópodos por Heras y Pollero (1992).

En el crustáceo *Pacifastacus leniusculus*, se determinó que hemocianina contenía 0.2% de lípidos y tomando en cuenta que ésta se encuentra en un 90% en el plasma, se afirma que alrededor del 17% de los lípidos asociados a proteína en la hemolinfa están en la hemocianina, sin embargo la cantidad de lípidos por molécula de hemocianina es muy poca (Hall *et al.* 1995).

El hecho de que se hayan detectado lípidos unidos a otras proteínas en machos de langostinos hace sospechar que no sólo las HDL contribuyen al transporte de lípidos en la hemolinfa, si no que otras biomoléculas como la VHDL y hemocianina con funciones

diferentes, como intervenir en el sistema de coagulación y el transporte de oxígeno hacia otros tejidos también pueden realizar el transporte de lípidos (Hall *et al.*, 1995).

Existen algunas sugerencias de que las VHDL encontradas en crustáceos pueden funcionar como partículas de transferencia de lípidos entre lipoproteínas (Komatsu *et al.*, 1993). Por otro lado, recientemente se ha reportado en machos inermuda del langostino *Pacifastacus leniusculus*, que la HDL, además de estar implicada en el transporte de lípidos juega un papel en el mecanismo de defensa de este crustáceo como iniciador de la respuesta inmune a componentes fungales (Hall *et al.*, 1995). Con esto se puede especular que el sistema fisiológico de los crustáceos, a pesar de ser tan sencillo, es multifuncional ya que permite que sus proteínas realicen varias tareas.

Análisis Cualitativo de las Clases de Lípidos

El análisis por cromatografía de capa fina, requiere cantidades de lípidos relativamente grandes. El tipo de muestra utilizado y la purificación de la HDL, requieren de una labor intensa. Además para tener un extracto manejable se necesita un volumen de muestra muy alto, mínimo 10 ml con una concentración de lípidos totales de 1 mg/ml; como no se contaba con este volumen de muestra de la lipoproteína, se recurrió a realizar el análisis únicamente con el plasma de ambos sexos.

Para el análisis cualitativo, primeramente se corrieron las muestras de plasma de *P. vannamei* y plasma humano, junto con estándares en una placa de cromatografía de

capa fina. Para esto, se utilizó una mezcla de solventes de multidesarrollo con el fin de separar todas las clases de lípidos (Fig. 7).

Al observar el patrón de las muestras en la Figura 7, se puede apreciar que por la intensidad de color y tamaño de las manchas, tanto en plasma de machos como en hembras, los lípidos que predominan son los lípidos polares aunque también se observa un poco de esteroides y diacilglicérolos; mientras que en plasma humano se observan manchas características de lípidos polares y de ésteres de esteroides.

Para verificar lo observado en la placa de multidesarrollo, se recurrió a hacer una separación exclusiva de lípidos no-polares. Para ello se desarrollaron 3 placas y revelaron con diferentes componentes, para tener una especificidad de las manchas, de acuerdo a Henderson y Tocher (1992).

En la Figura 8, se muestra una fotografía de una de las placas revelada con rodamina B. Al comparar las manchas producidas por las muestras con las de los estándares, se puede apreciar que en plasma de camarón de machos y hembras se ve el mismo patrón, alta concentración de lípidos polares en el origen, y dos manchas un poco más arriba a la altura de diacilglicérolos y esteroides. En cambio, en plasma humano se detecta una banda a la altura de ésteres de esteroides y apenas se alcanza a ver una pequeña mancha de lípidos polares en el origen.

En *Cancer magister* (Allen, 1972), se hizo un análisis similar en hemolinfa donde se observó que por cromatografía de capa fina los lípidos principales de la hemolinfa son lípidos polares, ácidos grasos libres, colesterol libre, diacilglicérolos,

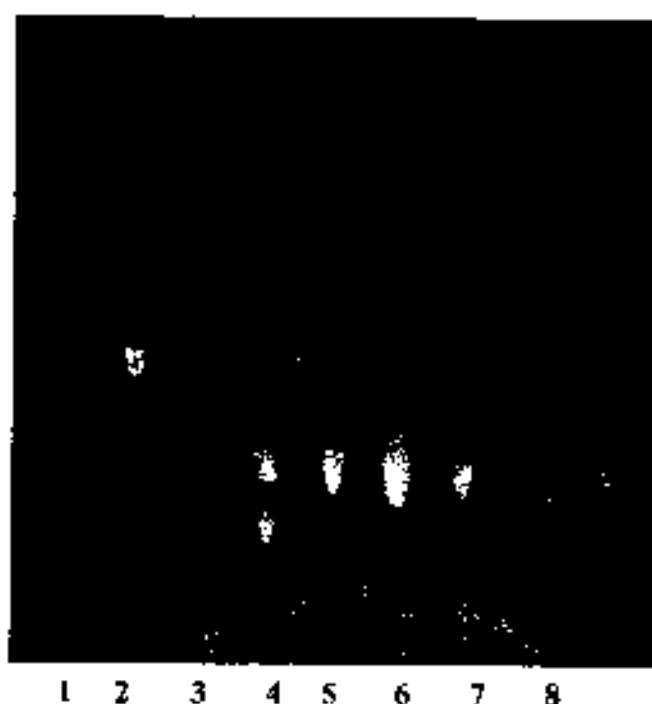


Figura 7. Separación de lípidos de plasma de *P. vannamei* por multidesarrollo en placas de cromatografía de capa fina. Carril 1, estándar de ácido linoleico; carril 2, estándares de acilglicérols; carril 3, estándares de esterols; carril 4, estándares de fosfolípidos; carril 5, plasma de *P. vannamei* machos; carril 6, plasma de *P. vannamei* hembras; carril 7, plasma humano, carril 8, BHT.

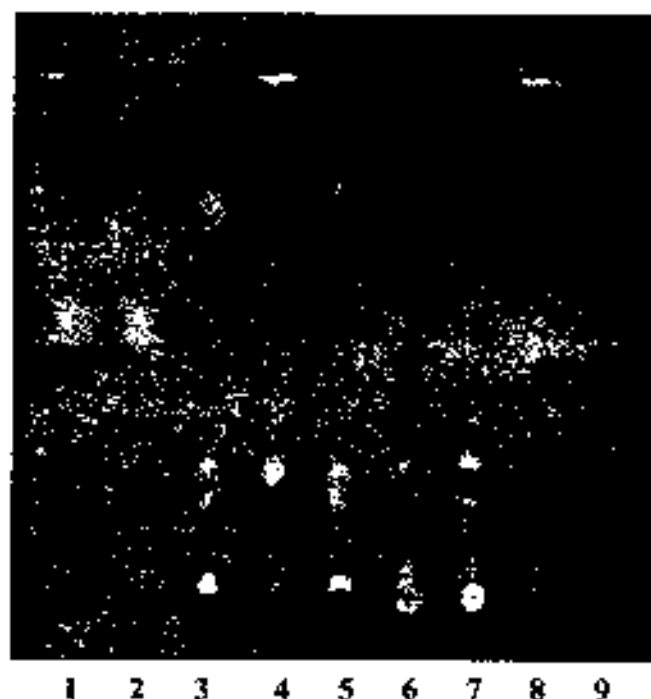


Figura 8. Separación de lípidos no-polares de plasma de *P. vannamei* por CCF, revelado con rodamina B. Carril 1, ácido linoleico; carril 2, ácido palmítico; carril 3, palmitinas; carril 4, esteroides; carril 5, estearinas; carril 6, plasma de *P. vannamei* machos; carril 7, plasma de *P. vannamei* hembras; carril 8, plasma humano; carril 9, BHT.

triacilglicérolos e hidrocarburos, no se detectaron monoacilglicérolos, ésteres metilados ni ésteres de esteroides.

Una placa similar se reveló con α -ciclodextrina y yodo (Fig. 9), para distinguir lípidos saturados de insaturados. Las mismas características se observaron para los lípidos de plasma de camarones hembras y machos. Lípidos polares insaturados localizados en el origen, siguen diacilglicérolos insaturados, probablemente esteroides, y una mancha en la parte superior que se asemeja a la producida por BHT. Por otro lado en plasma humano, se detectaron ésteres de esteroides, triacilglicérolos insaturados, esteroides libres y lípidos polares.

La presencia de insaturaciones en el plasma de *P. vannamei* seguramente se debe a que los ácidos grasos principales ya sea en forma libre o esterificada reportados en la hemolinfa de algunos crustáceos son palmítico, estéarico, palmitoleico, oleico, linoleico, 20:1, 20:4, 20:5, y 22:6 (Allen, 1972; Khayat *et al.*, 1994; Lee y Puppione, 1988; Stratakis *et al.*, 1992 y Teshima y Kanazawa, 1980). Por otra parte, los 1,2 diacilglicérolos son importantes ya que son intermediarios de la biosíntesis y catabolismo de fosfolípidos y triacilglicérolos, por lo que su presencia en la hemolinfa es de esperarse (Allen, 1972).

Desafortunadamente en este experimento no se cualificaron hidrocarburos, los cuales en esta mezcla de desarrollo se localizarían a la misma altura del BHT, como éste compuesto fué adicionado a las muestras de los extractos de lípidos es difícil afirmar que las manchas que se observan en las placas son hidrocarburos insaturados o BHT.



Figura 9. Separación de lípidos no-polares de plasma de *P. vannamei* por CCF, revelado con α -ciclodextrina y yodo. Carril 1, ácido linoleico; carril 2, ácido palmítico; carril 3, palmitinas; carril 4, esteroides; carril 5, estearinas; carril 6, plasma de *P. vannamei* machos; carril 7, plasma de *P. vannamei* hembras; carril 8, plasma humano; carril 9, BHT.

Allen (1972) reportó la presencia de hidrocarburos en placas de CCF en muestras de hemolinfa de hembras de *Cancer magister*. Por otro lado, en langostino, también se reportó presencia de hidrocarburos, medidos por medio del sistema Introspect TLC-FID (cromatografía de capa fina utilizando detector de ionización de flama) (Hall *et al.*, 1995).

Para investigar la presencia de esteroides en las muestras, se recurrió al revelado con solución ácida de cloruro férrico, en la Figura 10 se presenta una fotografía de la placa producto de este revelado. En las muestras de plasma de camarón solo se observan esteroides libres, mientras que en la de plasma humano además de esteroides libres se encuentra también ésteres de esteroides.

Actualmente existe una preocupación en cuanto al contenido de colesterol en el camarón, el cual es un alimento exquisito para el paladar de los humanos, desafortunadamente el alto contenido de colesterol ha limitado su consumo, ya que al colesterol se le ha atribuido relación directa con enfermedades cardiovasculares (King *et al.*, 1990).

Recientemente entre los especialistas en el análisis de alimentos y nutrición, se ha despertado la duda en cuanto a la pregunta ¿Todo el esteroide contenido en crustáceos es colesterol?. King *et al.* (1990), reportaron en cangrejo Dungeness y en camarón rosa cocinados, que la mayor parte del contenido de esteroides es atribuida a colesterol (72 y 147 mg /100 g) y β -sitosterol (78 y 157 mg /100 g). Mientras que Gordon (1982), había reportado anteriormente en camarón cocinado 128.9 mg /100 g de colesterol, 0.1 mg

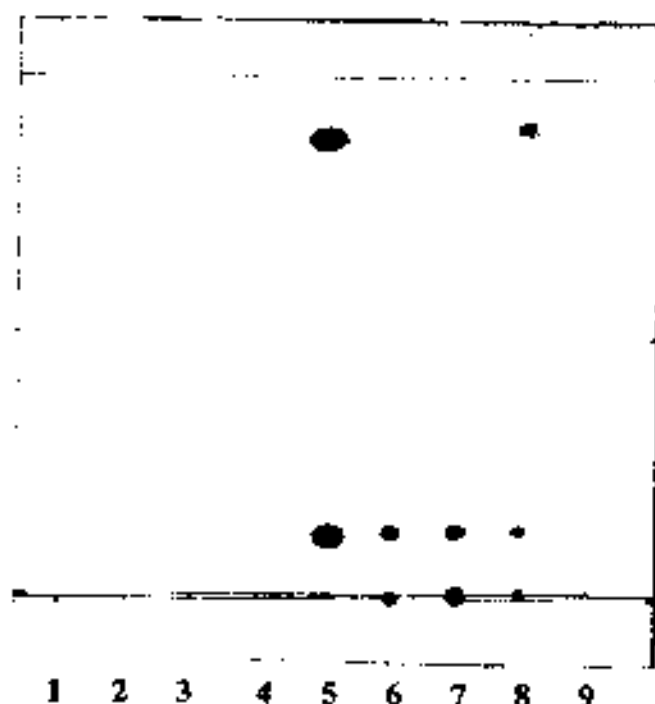


Figura 10. Separación de lípidos no-polares de plasma de *P. vannamei* por CCF, revelado con cloruro férrico. Carril 1, ácido linoleico; carril 2, ácido palmítico; carril 3, palmitinas; carril 4, estearinas; carril 5, esteroides; carril 6, plasma de *P. vannamei* machos; carril 7, plasma de *P. vannamei* hembras; carril 8, plasma humano; carril 9, BHT.

/100 g de 24-metilcolesterol y 0.1 mg /100 g de 24-etilcolesta-5-en-3- β -ol, 0.2 mg /100 g de 22-dehidrocolesterol y 0.1 mg /100 g de C₂₆ esterol.

Hasta ahora, no se ha encontrado referencia alguna que responda fielmente esta pregunta, pero se ha visto que mucho depende del método que se utiliza en la cuantificación, para especificar su presencia. La teoría que se maneja es la siguiente, se afirma que los compuestos pertenecientes al grupo de esteroides que no son colesterol en crustáceos, pueden ser alimentos valiosos en la dieta del hombre para prevenir enfermedades cardíacas, ya que estos son absorbidos a través del tracto intestinal y pueden bajar la absorción de colesterol provocando una respuesta no-hiperlipidémica (Karakoitsidis *et al.*, 1995 y King *et al.*, 1990).

Estas indicaciones de que el colesterol de alimentos marinos no produce un incremento en los lípidos sanguíneos o colesterol sérico, también puede deberse a que la relación del colesterol a ácidos grasos ω -3 es más baja en el tejido de camarón que en muchos otros alimentos del mar, 500 mg /100 g de ácidos grasos ω -3 contra 115 mg /100 g de colesterol (Higuera-Ciapara, 1996).

Los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 de fuentes marinas han sido objeto de mucha discusión, debido a su efecto protector en enfermedades cardiovasculares, su función como modulador del metabolismo del ácido araquidónico a eicosapentaenoico, y su papel en el desarrollo y función del cerebro y la retina (Cherian y Sim, 1995).

Sin embargo, en las referencias consultadas en cuanto al análisis de crustáceos, principalmente dentro de los especialistas en biología y bioquímica, el interés no es

precisamente la cualificación de los esteroides, sino ¿Cuántos son?, ¿En que forma se encuentran en el organismo?, ¿Donde se encuentran?, ¿Qué función desempeñan? y ¿Cómo se biosintetizan?

Basándose en estas referencias se tiene que los crustáceos marinos son incapaces de sintetizar los esteroides de acetato o mevalonato, y no pueden realizar la bioconversión de colesterol a otros esteroides; por lo que los esteroides encontrados en sus tejidos deben de ser originados de la dieta (Ilias *et al.*, 1986; Teshima y Kanazawa, 1971; y Ulrich, 1994).

Se ha reportado que la proporción de esteroides en langosta *Panulirus japonicus* y en cangrejo *Portunus trituberculatus* es 100% colesterol, mientras que en camarón *Penaeus japonicus* el 90% es colesterol, el 3% 22-dihidrocolesterol y el 7% es 24-metilcolesterol (Teshima y Kanazawa, 1971).

Por otro lado, los ésteres de colesterol se han encontrado en pequeñas cantidades o prácticamente ausentes en la hemolinfa de los crustáceos (Allen, 1972 y Lee, 1991). Sin embargo, se ha reportado que son capaces de esterificar esteroides en el hepatopáncreas (Young *et al.*, 1992).

Existe controversia todavía en cuanto al contenido de colesterol en camarón. En este estudio por el método de CCF no fué posible determinar cual de los esteroides es el predominante, únicamente se puede afirmar que la mayor parte de los esteroides determinados por este método se encuentran en forma libre.

En experimentos preliminares se hizo un desarrollo en el que se incluyeron los estándares de β -sitosterol, dihidrobrasicasterol, campesterol, colesterol libre y esterol esterificado, y las placas revelaron sólo separación apreciable del éster de colesterol y los esterolés libres (Fig. 11).

Los fosfolípidos son indispensables para los crustáceos debido no solamente a su limitada habilidad para la biosíntesis de fosfolípidos de ácidos grasos y/o diglicéridos, sino también a su función como constituyente de las lipoproteínas esenciales para el transporte de los lípidos. (Alava *et al.*, 1993).

En este ensayo, se recurrió a identificar fosfolípidos dentro de los lípidos polares utilizando un desarrollo sencillo y un revelado con "phospray", específico para fósforo (Henderson y Tocher, 1992). En la Figura 12, se observa una fotografía de una placa desarrollada de esta manera, en la cual los fosfolípidos que se distinguen en las muestras de plasma de camarón son fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilcolina (PC); mientras que en plasma humano el fosfolípido mayoritario es fosfatidilcolina.

Debido a que el desarrollo sencillo no distinguía fosfolípidos minoritarios y como no se obtenía una buena separación de estos se recurrió a hacer un desarrollo en doble dimensión. Para ello se desarrollaron 3 placas que fueron reveladas con phospray, ninhidrina, específica para grupos amino, y reactivo de Dragendorff's específico para colina (Henderson y Tocher, 1992).

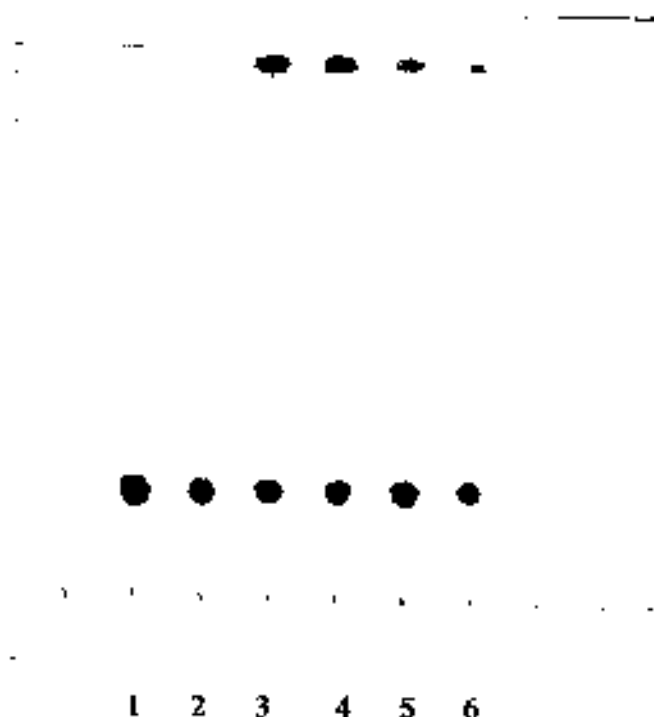


Figura 11. Separación de esteroides por cromatografía de capa fina. Carriles 1 y 2, mezcla de β -sitosterol, campesterol y dihidrobrasicasterol; carriles 3 y 4 mezcla de colesterol y linolenato de colesterol; carriles 5 y 6 mezcla de β -sitosterol, campesterol, dihidrobrasicasterol, colesterol y linolenato de colesterol.

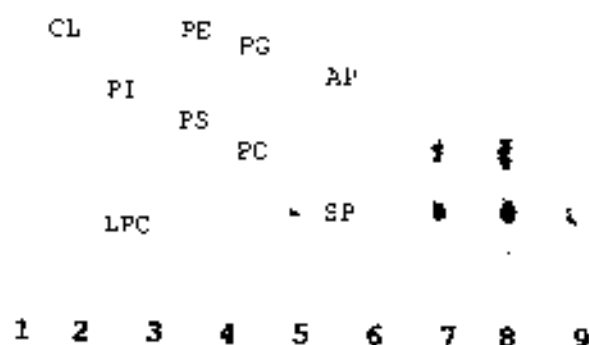


Figura 12. Separación de lípidos polares de plasma de *P. vannamei* por CCF. Carriles 1-5, estándares individuales, carril 6, mezcla de estándares, carriles 7 y 8, plasma de *P. vannamei* machos y hembras; carril 9, plasma humano. CL, cardioplipina; PI, fosfatidilinositol; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina; PG, fosfatidilglicerol; PC, fosfatidilcolina; AP, ácido fosfatídico; SP, esfingomielina; LPC, lisofosfatidilcolina.

En las Figuras 13 y 14, se muestran fotografías del desarrollo de las muestras de plasma de machos y hembras reveladas con phospray, donde sobresalen 4 manchas, que al compararlas con los estándares, y tomando en cuenta el revelado con ninhidrina (Figura 15) y reactivo de Dragendorff's (Figura 16), se deduce que se tiene fosfatidiletanolamina y en menor proporción fosfatidilserina. Una mancha más intensa revela la presencia de fosfatidilcolina y manchas apenas perceptibles, reflejan la presencia de esfingomielina y lisofosfatidilcolina.

Se observaron dos compuestos más que no fueron identificados, ya que sus Rf difieren bastante con los de los estándares, estos compuestos guardan similitud en cuanto a polaridad en la primera mezcla de solventes con fosfatidilserina y el otro con fosfatidiletanolamina, pero al aplicar la segunda mezcla de solventes estos compuestos se separan y no coinciden en Rf con ninguno de los estándares que se manejaron.

En hemolinfa de crustáceos los fosfolípidos dominan la porción de los lípidos del complejo lipoproteína, de los cuales la fosfatidilcolina es la principal seguido por la fosfatidiletanolamina, aunque también se reportan en menor cantidad la fosfatidilserina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina y esfingomielina (Lee, 1991; Lee y Puppione, 1978; en cuenta que por CCF se identificó a diacilgliceroles insaturados como componentes principales de este grupo.

Los valores de esta tabla son similares tanto para plasma como para la HDL aislada, incluso no se observa gran diferencia entre sexos. En todos los casos la clase de lípido mayoritario es la de los fosfolípidos (1.4 a 1.9 mg/ml), observándose cantidades



Figura 13. Identificación de lípidos polares de plasma de *P. vannamei* machos por CCF en dos dimensiones. A. mezcla de estándares; B. plasma de *P. vannamei* machos. PE, fosfatidiletanolamina; AP, ácido fosfatídico; CL, cardiolipina; PI, fosfatidilglicerol; PS, fosfatidilserina; PL, fosfatidilinositol; PC, fosfatidilcolina; SP, esfingomielina; LPC, lisofosfatidilcolina.



Figura 14. Identificación de lípidos polares de plasma de *P. varzamei* hembras por CCF en dos dimensiones. A. mezcla de estándares; B. plasma de *P. varzamei* hembras. CL, cardiopina; PE, fosfatidiletanolamina; AP, ácido fosfatídico; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PS, fosfatidilserina; PC, fosfatidilcolina; SP, esfingomicina; LPC, lisofosfatidilcolina.

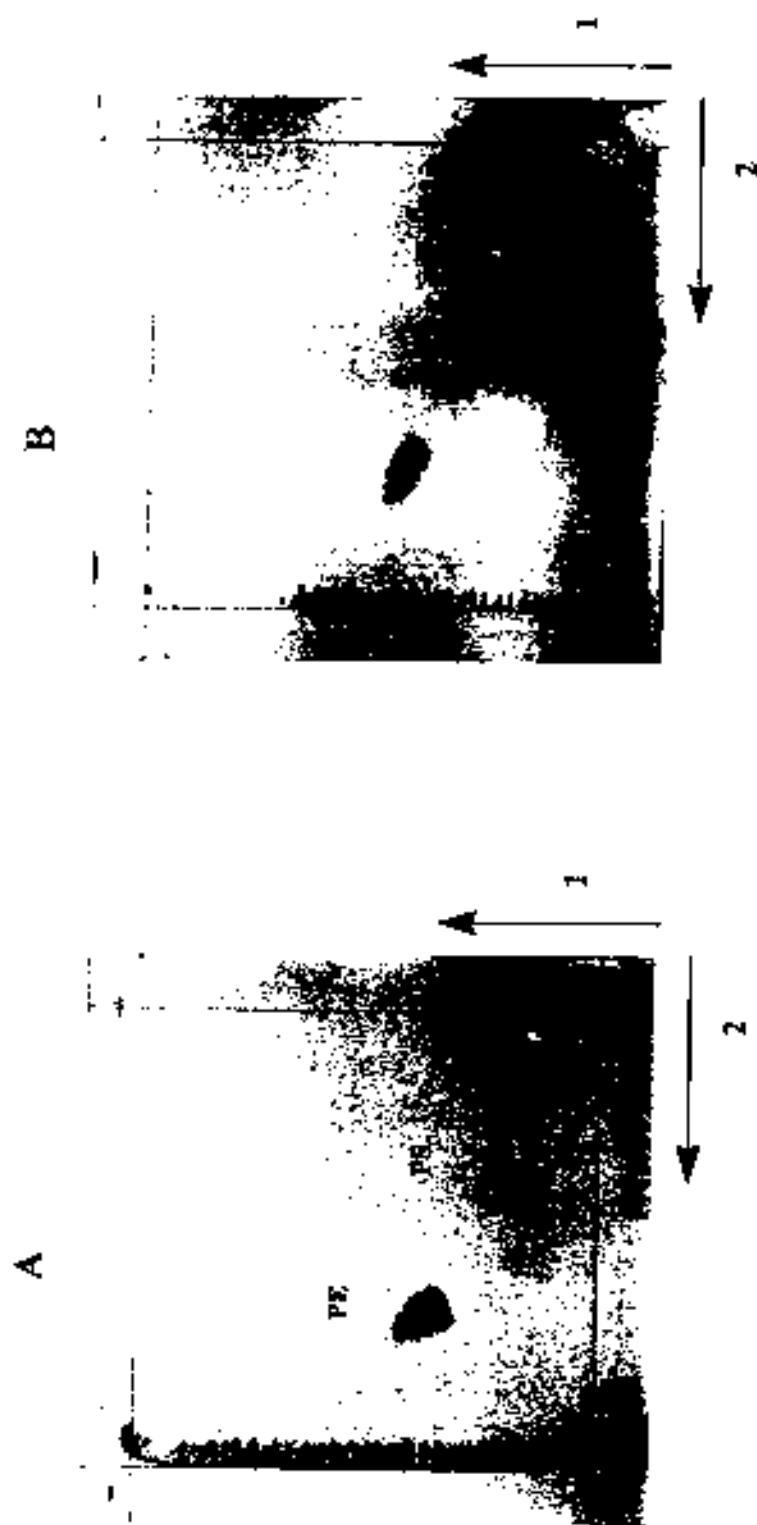


Figura 15. Identificación de lípidos polares con grupos amino en plasma de *P. vannamei* machos por CCF en dos dimensiones. A. mezcla de estándares; B. plasma de *P. vannamei* machos. PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina.

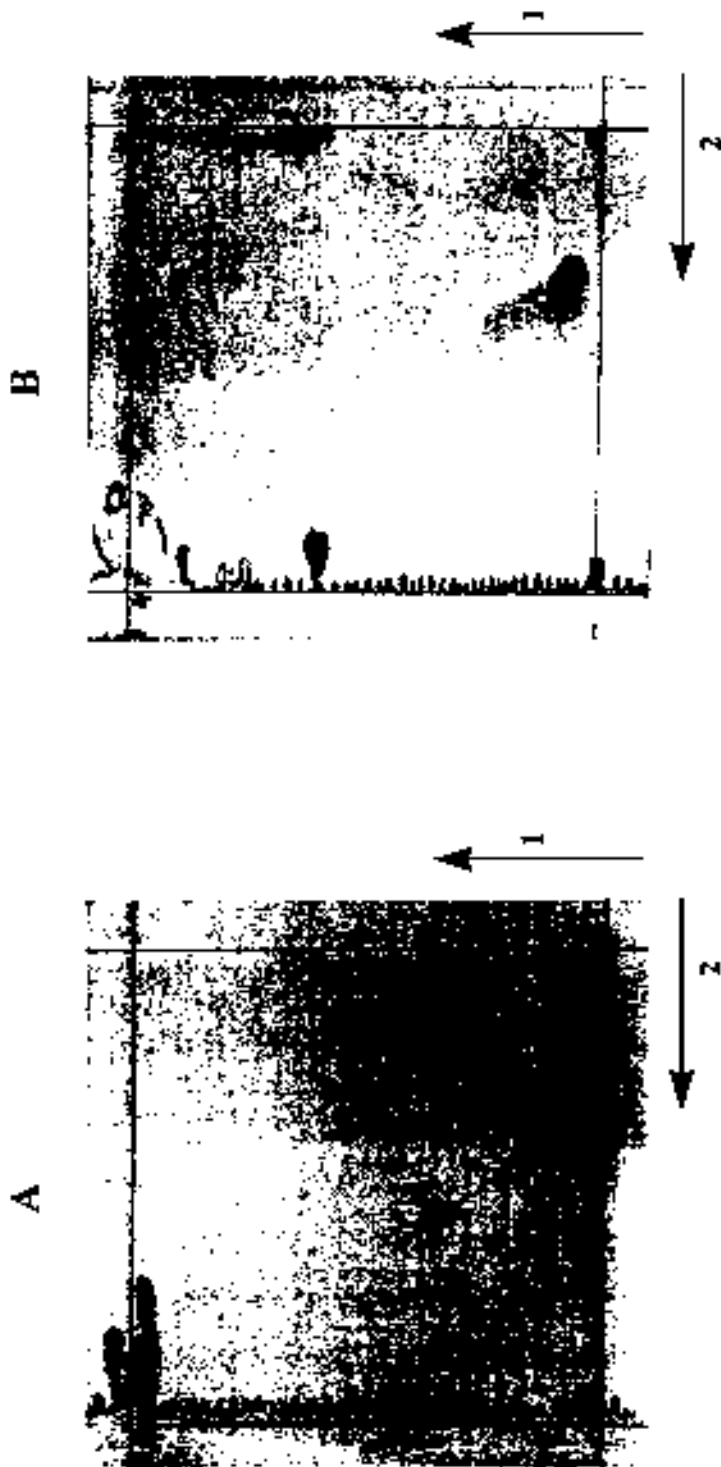


Figura 16. Identificación de lípidos derivados de colina en plasma de *P. vannamei* machos por CCF en dos dimensiones. A. mezcla de estándares; B. plasma de *P. vannamei* machos. PC, fosfatidilcolina; SP, esfingomielina; LPC, lisofosfatidilcolina.

Lee y Puppione, 1988; Mourente *et al.*, 1994; Spaziani *et al.*, 1986; Spaziani y Wang 1991 y Stratakis *et al.*, 1992).

En este estudio no se determinaron pigmentos lipofílicos, sin embargo a simple vista el tono observado en la región lipoproteica al hacer el gradiente fué de un color amarillo pálido. Se ha reportado una lipoproteína de alta densidad no específica del sexo de un color ligeramente naranja en el langostino *Pacifastacus leniusculus* (Hall *et al.*, 1995).

Por otra parte, Spaziani y Wang (1991), reportaron que tanto las lipoproteínas de hembras como de machos muestran un espectro completo del amarillo al rojo. Además se ha comprobado que los pigmentos asociados a las lipoproteínas de crustáceos son carotenos, astaxantinas y cantaxantinas (Lee, 1991).

Cuantificación de las Clases de Lípidos

Los lípidos en plasma y en la lipoproteína de camarón blanco *P. vannamei* se analizaron cuantitativamente por grupos, utilizando técnicas enzimáticas diseñadas para plasma de humanos y modificadas para muestras de camarón. Las clases de lípidos determinadas fueron ácidos grasos libres, acilglicérols, esterols y fosfolípidos.

En la Tabla 7, se presentan los valores que se obtuvieron en plasma y en la HDL de camarón blanco de hembras y machos en mg/ml. Para el caso de ácidos grasos libres, esterols y fosfolípidos el valor en las tablas se encuentra expresado como el compuesto que se utilizó como estándar, en el caso de acilglicérols se utilizó dilinoleína, tomando

Tabla 7. Cuantificación de las clases de lípidos en muestras de *P. vannamei*.

MUESTRA	CLASES DE LÍPIDOS (mg/ml)*			
	AGL ¹ (Ac. Linoleico)	ACG ² (Dilipoleína)	ESTEROLES ² (Colesterol)	FOSFOLÍPIDOS (Lecitina)
PLASMA				
H	3.87±0.39	36.84±4.89	25.32±1.53	1.434±0.327
M	1.26±0.23	39.39±2.61	27.81±1.77	1.392±0.291
HDL				
H	2.98±0.87	29.74±0.09	21.17±0.49	1.839±0.074
M	2.98±0.13	28.90±1.11	21.526±2.37	1.957±0.103

* Media y desviación estándar de tres repeticiones

AGL. - ácidos grasos libres, ACG = acilglicérols

H = hembras, M = machos

¹ X 10¹.² X 10².

en cuenta que por CCF se identificó a diacilgliceroles insaturados como componentes principales de este grupo.

Los valores de esta tabla son similares tanto para plasma como para la HDL aislada, incluso no se observa gran diferencia entre sexos. En todos los casos la clase de lípido mayoritario es la de los fosfolípidos (1.4 a 1.9 mg/ml), observándose cantidades menores de acilgliceroles (0.28 a 0.39 mg/ml) y esteroides (0.21-0.27 mg/ml) y con valores mínimos los ácidos grasos libres (0.003 a 0.004 mg/ml).

Por otra parte, en la Tabla 8 se muestran los valores de las clases de lípidos expresados como porcentaje de la molécula de proteína. Como se nota en la tabla, en el plasma sólo se encuentra un 2% de lípidos, mientras que la molécula de lipoproteína está constituida con un 57%, sin embargo, en ambos casos los fosfolípidos son la clase de lípido principal, le siguen los acilgliceroles, esteroides y como componentes minoritarios los ácidos grasos libres.

Esto es similar a los reportes en plasma de *Cancer magister* (Allen, 1972) y *Penaeus semisulcatus* (Khayat *et al.*, 1994), donde se encontraron a los fosfolípidos como predominantes, contribuyendo el 70% de los lípidos totales, le seguían los acilgliceroles (10-16%) y por último los esteroides (10-11%).

Además, en la Tabla 9, se presentan los valores de las clases de lípidos que se han reportado en las lipoproteínas no asociadas con el sexo de algunos crustáceos. Al comparar estos datos se observa que al igual que en el plasma y HDL de *P. vannamei* los lípidos predominantes en las HDL de otras especies de crustáceos son los fosfolípidos

Tabla 9. Composición de los lípidos de HDL aisladas de la hemolinfa de algunos crustáceos.

ESPECIE	AGL %	ACG %	E %	FL %	REFERENCIAS
<i>P. vannamei</i> H	0.07	9.83	4.88	42.39	Este trabajo
<i>P. vannamei</i> M	0.06	9.17	4.75	43.30	Este trabajo
<i>Penaeus japonicus</i> HDL ₂	11	17	7	47	Teshima y Kanazawa, 1980
<i>Penaeus japonicus</i> HDL ₃	5	6	0	72	Teshima y Kanazawa, 1980
<i>Penaeus interruptus</i>	1	3	4	88	Lee y Puppione, 1978
<i>Callinectes sapidus</i>	T	5	3	89	Lee y Puppione, 1988
<i>Limulus polyphemus</i>	ND	3	15	75	Lee, 1991
<i>Cancer magister</i> HDL ₂	ND	12	14	73	Spaziani y Wang, 1991
<i>Cancer magister</i> HDL ₃	ND	21	18	61	Spaziani y Wang, 1991
<i>Putamon potamius</i>	ND	ND	3	80	Stratakis <i>et al.</i> , 1992
<i>Pacifastacus lemniscatus</i>	0.6	28.1	ND	60.9	Hall <i>et al.</i> , 1995

AGL = Ácidos Grasos Libres; ACG = Acilglicéoles, E = Esteroles; FL = Fosfolípidos
 T = 1 raras, ND = No determinado

Tabla 10. Análisis comparativo de determinación de lípidos totales por el método colorimétrico y por la sumatoria de las clases de lípidos en muestras de *P. vannamei*.

MUESTRA	<u>LÍPIDOS TOTALES</u> <u>mg/ml</u>		<u>LÍPIDOS TOTALES</u> <u>P : L</u>		<u>LÍPIDOS TOTALES %L</u>	
	<u>COLORIMÉTRICO</u>	<u>SUMATORIA</u>	<u>COLORIMÉTRICO</u>	<u>SUMATORIA</u>	<u>COLORIMÉTRICO</u>	<u>SUMATORIA</u>
H	0.7886	0.7408	1:0.0246	1:0.0231	2.40	2.26
PLASMA						
M	0.8513	0.7665	1:0.0250	1:0.0219	2.44	2.15
H	1.4256	2.4809	1:0.7671	1:1.3349	43.41	57.17
HDL						
M	0.9453	2.5906	1:0.4898	1:0.4898	32.87	57.30

(47-89%), le siguen los acilglicerolos (3-28%), luego los esterolos (0-18%), y por último los ácidos grasos libres (0.6-11%).

En la Tabla 8, también se reportan los valores de las clases de lípidos expresados como relación Proteína:Lípido (P:L). Aquí se puede observar que la proporción de los lípidos comparada con la de la proteína es notoria, donde sólo para los fosfolípidos la relación es cercana a la unidad, y en el caso de la sumatoria el valor de los lípidos supera marcadamente el de la proteína (1 parte de proteína por 1.3 partes de lípidos).

Komatsu *et al.* (1993), cuantificaron fosfolípidos mediante técnicas enzimáticas en lipoproteínas de camarón y cangrejo, y reportan en lipoproteínas de la clase HDL, valores de relación proteína a fosfolípido (P:FL) de 1:1.44 para *Macrobrachium rosenbergii*, 1:0.83 para *Penaeus japonicus* 1:0.75 para *Charybdis feriata* y 1:0.635 para *Eriocheir japonica*. En base a estos datos se observan diferencias dentro de las especies, sin embargo se mantienen en un rango, mismo en el que se encuentran los valores obtenidos en la HDL de *P. vannamei*.

A su vez, estos autores reportaron en las mismas especies valores en acilglicerolos los cuales fueron semejantes a los obtenidos en *P. vannamei*. En cuanto a las cuantificaciones de ácidos grasos libres y esterolos por medio de técnicas enzimáticas en especies de crustáceos a la fecha no existe información al respecto, éste es el primer estudio que engloba a las cuatro clases de lípidos en plasma y lipoproteínas de alta densidad no asociadas con el sexo.

Por otro lado, en la Tabla 10 se muestra una comparación de los resultados de lípidos totales, obtenidos mediante la técnica de cuantificación por el método colorimétrico de la SPV y por la sumatoria de las clases de lípidos, mismas que se cuantificaron por técnicas enzimáticas. Los valores de ambas formas son similares para la muestra de plasma, pero no para la HDL.

Además, los valores de hembras y machos por la técnica colorimétrica difieren bastante, en cambio en la sumatoria se ven muy semejantes. Ahora bien, si se observan los valores para "Precinorm" en la Tabla 6, la sumatoria de las clases de lípidos es de 5.1506 mg/ml, similar al que se obtuvo en el mismo por la técnica colorimétrica (4.8505 mg/ml).

Aunque la química exacta de la reacción no se ha establecido todavía, en el análisis de lípidos usando la determinación por la sulfofosvainillina, existen diferencias en la coloración dependiendo del tipo de muestra a la cual se le determinen los lípidos totales. Se ha postulado que los lípidos que contienen uniones dobles carbono-carbono dan cetonas o cetales durante el tratamiento con ácido sulfúrico concentrado y caliente, y que la vainillina en medio ácido se condensa con estos compuestos para dar productos coloreados. Pero la formación del color no es igual con todos los compuestos; los lípidos saturados no dan color, los lípidos poli-insaturados dan menos color que los compuestos monoinsaturados, debido presumiblemente a su degradación en fragmentos más pequeños en presencia de ácido sulfúrico (Sonnenwirth y Jarett, 1986).

Tabla 8. Proporción de las clases de lípidos en muestras de *P. varanami* tomando como base la concentración de proteína de la muestra.

MUESTRA	A G L		A C G		E S T E R O L E S		F O S F O L I P I D O S		Σ L I P I D O S	
	P:L	% L	P:L	% L	P:L	% L	P:L	% L	P:L	% L
H	1:0.00004	0.004	1:0.00551	0.54	1:0.00263	0.26	1:0.01495	1.46	1:0.02314	2.26
PLASMA										
M	1:0.00003	0.003	1:0.00554	0.54	1:0.00272	0.27	1:0.01366	1.33	1:0.02394	2.15
H	1:0.0016	0.07	1:0.2296	9.83	1:0.1139	4.88	1:0.9897	42.39	1:1.3349	57.17
HDL										
M	1:0.0015	0.06	1:0.2149	9.17	1:0.1115	4.75	1:1.0143	43.30	1:1.3423	57.30

Al parecer la diferencia de los valores obtenidos con estas técnicas, está relacionado con el tipo de muestra. Dentro de los compuestos identificados por CCF, se detectaron en su mayoría lípidos insaturados, tal vez las insaturaciones de los ácidos grasos unidos a los compuestos mayoritarios (fosfolípidos) sean múltiples y esto hace que no se pueda estimar fielmente su valor por colorimetría.

Por otra parte, en base a los datos crudos de las fracciones en el aislamiento de la HDL, en la Tabla I, se puede notar que del total de las proteínas del plasma ésta representa el 0.88% en hembras y 1.30% en machos. Ahora bien, tomando en cuenta los lípidos medidos por técnicas enzimáticas se puede afirmar que la HDL contribuye al menos con el 51.77% en hembras y 80.93% en machos de los lípidos del plasma, ya que otras clases de lípidos no fueron cuantificados.

Lee y Puppione (1978), afirman que más del 90% de los lípidos de la hemolinfa de crustáceos pueden ser aislados en el intervalo de densidad de 1.12-1.21 g/ml, el cual corresponde a la clase de lipoproteínas HDL₂. Sin embargo, Hall *et al.* (1995), reportan que la HDL aislada de *Pacifastacus leniusculus* representa tan sólo el 0.4% y contribuye con sólo el 30% de los lípidos del plasma.

Los valores obtenidos de la concentración de HDL en *P. vannamei* son sólo buenas aproximaciones, ya que ésta se recolecta de la zona en la que con el control de negro de Sudan, a simple vista se observa la mayor proporción de lípidos, durante el aislamiento por ultracentrifugación en gradiente de densidad.

En La Fig. 2, se observó que la HDL no sólo se encontraba en la fracción lipoproteica, sino que aparecía también en otras fracciones. Además existen pérdidas durante los pasos de aislamiento, no toda la HDL se recupera, podría decirse que en estas condiciones del experimento estos son los resultados que se obtuvieron, y que ésta es sólo una estimación.

CONCLUSIONES

Como ya se ha mencionado, los lípidos juegan un papel principal en la vida del camarón. Representan una de las principales reservas de energía, sirven como transportadores de vitaminas, son precursores de hormonas, componentes de membranas, y además algunos de ellos son esenciales para la sobrevivencia de estos organismos.

En este estudio se cuantificaron lípidos totales en plasma y en la lipoproteína plasmática (HDL) del camarón blanco *P. vannamei*, por medio de la técnica colorimétrica de la sulfofosfovainillina (SPV), la cual mostró ventajas comparables a las que se tenían con los métodos gravimétricos. Con esta técnica se obtuvieron valores muy similares en el plasma de ambos sexos, sin embargo, en la HDL los lípidos fueron superiores en las hembras.

También se identificaron los lípidos presentes en plasma, utilizando cromatografía de capa fina. Se detectaron diacilglicérols insaturados, esteróles libres, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomiélin y lisofosfatidilcolina, tanto en hembras como en machos. Cabe mencionar que probablemente existan otros compuestos más que no pudieron detectarse, sin embargo, en las condiciones experimentales estos fueron los compuestos que se pudieron identificar.

Se pudo comprobar también que las técnicas enzimáticas de cuantificación de ácidos grasos libres, acilgliceroles, esteroides y fosfolípidos, utilizadas para el diagnóstico clínico de humanos, son aplicables también a plasma y HDL de camarón blanco. Con esto se demostró el predominio de los fosfolípidos tanto en las muestras de plasma como en las de la HDL de *P. vannamei*, como se ha observado en otras especies de crustáceos.

La información que se obtuvo en el presente estudio, es base para investigaciones sobre ciencia básica de aplicación en acuicultura. Se espera en un futuro poder utilizar estas técnicas para la caracterización de los lípidos en otros estadios de *P. vannamei*, ya sea cultivado o silvestre, así como realizar estudios comparativos entre diferentes ambientes o entre especies, con el fin de crear una base de datos en diversas poblaciones.

Este es solo un paso de todos los que deberán por lograrse para ampliar el conocimiento de los lípidos que integran las lipoproteínas de transporte, y sobre todo que con esta información se podrán resolver problemas que involucren el uso de los lípidos como marcadores de estados de nutrición en el camarón y otros crustáceos, ya que estos son modelos interesantes para el estudio de procesos fisiológicos que involucren el transporte de lípidos en el hombre.

BIBLIOGRAFIA

- Akiyama D. M. y Dominy W. G. (1992) Penaeid Shrimp Nutrition for the Comercial Feed Industry. Texas Shrimp Farming Manual Vol. 1, 50 pp. Corpus Christy, Texas.
- Alava V. R., Kanazawa A., Teshima S. y Koshio S. (1993) Effect of Dietary Phospholipids and n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids on Ovarian Development of Kuruma Prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59 (2): 345-351.
- Allen W. V. (1972) Lipid Transport in the Dungeness Crab, *Cancer magister* Dana. *Comp. Biochem. Physiol.* 43B: 193-207.
- Araujo M. A. y Lawrence A. L. (1993) Fatty Acid Profiles of Muscle and Midgut Gland from wild *Penaeus californiensis*, *P. occidentalis*, *P. setiferus*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. *J. World Aquacul. Soc.* 24 (3): 425-428.
- Arnarong P. (1989) Economic Analysis of the Giant Fresh-Water Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Production in Changwat Nakhon Pathom (Thailand) in 1986/1987. Bibliographic citation: Bangkok, Thailand. Abstracts.
- Bachorik P. S. (1982) Collection of Blood Samples for Lipoprotein Analysis. *Clin. Chem.* 28 (6): 1375-1378.
- Barnes R. D. (1989) *Zoología de los Invertebrados 5th.*, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F. 599-600.
- Bligh E. G. y Dyer W. J. (1959) A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (8): 911-917.
- Bolaños A. V. (1996) Composición de Proteínas de los Productos Utilizados en la Lactancia. Tesis de Licenciatura Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Bottino N. R., Gennity J., Lilly M. L., Simmons E. y Finne G. (1980) Seasonal and Nutritional Effects on the Fatty Acids of Three Species of Shrimp, *Penaeus setiferus*, *Penaeus aztecus* and *Penaeus duorarum*. *Aquaculture.* 19: 139-148.

- Briggs M. R. P., Jauncey K. y Brown J. H. (1988) The Cholesterol and Lecithin Requirements of Juvenile Prawn *Macrobrachium rosenbergii* Fed Semi-purified Diets. *Aquaculture*. 70: 121-129.
- Briggs M. R. P., Brown J. H. y Fox C. J. (1994) The Effect of Dietary Lipid and Lecithin Levels on the Growth, Survival, Feeding Efficiency, Production and Carcass Composition of Post-Larval *Penaeus monodon* Fabricus. *Aquacult. Fish. Manage.* 25 (3): 279-294.
- Cahu C., Guillaume J. C., Stéphan G. y Chim L. (1994) Influence of Phospholipid and Highly Unsaturated Fatty Acids on Spawning Rate and Egg and Tissue Composition in *Penaeus vannamei* Fed Semi-Purified Diets. *Aquaculture*. 126: 159-170.
- Calderón de la Barca A. M. (1994) Técnicas Inmunoquímicas Manual de Prácticas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México.
- Chapman M. J. (1980) Animal Lipoproteins: Chemistry, Structure, and Comparative Aspects. *J. Lipid Res.* 21: 789-852.
- Chen H. (1993) Requirements of Marine Shrimp, *Penaeus monodon*, Juveniles for Phosphatidylcholine and Cholesterol. *Aquaculture*. 109: 165-176.
- Cherian G. y Sim J. S. (1995) Dietary α -Linolenic Acid Alters the Fatty Acid Composition of Lipid Classes in Swine Tissues. *J. Agric. Food Chem.* 43 (11): 2911-2916.
- Cunningham M., Pollero R. y González A. (1994) Lipid Circulation in Spiders. Transport of Phospholipids, Free Fatty Acids and Triacylglycerols as the Major Lipid Classes by a High-Density Lipoprotein Fraction Isolated from Plasma of *Polybetes pythagoricus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 333-338.
- D'Abramo L.R. y Sheen S. (1993) Polyunsaturated Fatty Acid Nutrition in Juvenile Freshwater Prawn *Macrobrachium rosendergii*. *Aquaculture*. 115: 63-86.
- Dall W., Chandumpai A. y Smith D. M. (1993) The Fate of Some ^{14}C -Labelled Dietary Lipids in the Tiger Prawn *Penaeus esculentus*. *Mar. Biol.* 115: 39-45.
- Figueroa Soto C. G., Vazquez Moreno L., Higuera Ciapara I. y Yepiz Plascencia G. M. (1996) Purification of Hemocyanin from the White Shrimp *Penaeus vannamei* Boone, by Gel Immobilized Metal Chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* (Enviada para publicación).

- Frings C. S. y Dunn R. T. (1970) A Colorimetric Method for Determination of Total Serum Lipids Based on the Sulfo-phospho-vanillin Reaction. *Am. J. Clin. Path.* 53: 89-91.
- González-Baró M. R. y Pollero R. J. (1993) Palmitic Acid Metabolism in Hepatopancreas of the Freshwater Shrimp *Macrobrachium borelli*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B:71-75.
- Gordon D. F. (1982) Sterols in Mollusks and Crustacea of the Pacific Northwest. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 59:536-545.
- Guay J. C., Kayama M., Murakami Y. y Ceccaldi H. J. (1976) The Effects of a Fat-Free Diet and Compounded Diets Supplemented with Various Oils on Molt, Growth and Fatty Acid composition of Prawn, *Penaeus japonicus* Hata. *Aquaculture*. 7: 246-254.
- Hall M., van Heusden M. C. y Söderhäll K. (1995) Identification of the Major Lipoproteins in Crayfish Hemolymph as Proteins Involved in Immune Recognition and Clotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 939-946.
- Hara A. y Radin N. S. (1978) Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. *Analytical Biochemistry*. 90: 420-426.
- Hauerland N. H. y Bowers W. S. (1989) Comparative Studies on Arthropod Lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 131-141.
- Henderson R. J. y Tocher D. R. (1992) Thin Layer Chromatography. En Lipid Analysis. A Practical Approach (Edited by Hamilton R. J. y Hamilton S.), pp. 65-111. Oxford University Press, Walton Street, Oxford.
- Heras H. y Pollero R. (1992) Hemocyanin as an Apolipoprotein in the Cephalopod *Octopus tehueltchus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1125: 245-250.
- Higuera-Ciapara I. (1996) Quality of Aquacultured Shrimp. Proceedings of the World fisheries Congress. Athens, Greece. pp. 85-93.
- Ilias A. M., Lim D. S., Connor W. F., Ahmad M. U. y Caldwell R. S. (1986) The Biosynthesis, Absorption and Tissue Distribution of Dietary Shellfish Sterols in the Crab. *Fette-Seifen-Anstrichyn. Abstracts.* 88: 372-374.

- Kanazawa A., Teshima S., Tokiwa S., Endo M., Razek A. y Fatma A. (1979) Effects of Short-Necked Clam Phospholipids on the Growth of Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45 (8): 961-965.
- Kanazawa A., Teshima S. y Sakamoto M. (1985) Effects of Dietary Lipids, Fatty Acids and Phospholipids on Growth and survival of Prawn *Penaeus japonicus* Larvae. *Aquaculture*. 50: 39-49.
- Kanazawa A. y Koshio S. (1994) Lipid Nutrition of Spiny Lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda, Palinuridae): A review. *Crustaceana. Abstracts* 67 (2): 226-232.
- Karakoltsidis P. A., Zotos A. y Constantinides S. M. (1995) Composition of the Commercially Important Mediterranean Finfish, Crustaceans and Molluscs. *Journal of Food Composition and Analysis*. 8: 258-273.
- Kattner G., Wehrmann S. y Merk T. (1994) Interannual Variations of Lipids and Fatty Acids During Larval Development of *Cungron* spp. in the German Bight, North Sea. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B: 103-110.
- Khayat M., Shenker O., Funkenstein B., Tom M., Lubzens E. y Tietz A. (1994) Fat Transport in the Penaeid Shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Isr. J. Aquacult.* 46: 22-32.
- King I., Childs M. T., Dorsett C., Ostrand J. G. y Monsen E. R. (1990) Shellfish: Proximate Composition, Minerals, Fatty Acids, and Sterols. *J. Am. Diet. Assoc.* 90: 677-685.
- Komatsu M., Ando S. y Teshima S. (1993) Comparison of Hemolymph Lipoproteins from Four Species of Crustacea. *J. Exp. Zool.* 266: 257-265.
- Kozlova T. y Khotimchenko. (1993) Fatty Acid Composition of Endemic Baikal Fish and Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B: 97-103.
- Krupp M. A., Tierney L. M., Jawetz E., Roe R. L. y Camargo C. A. (1986) Diagnóstico Clínico y de Laboratorio. Octava Edición. pp. 212. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lee R. F. (1991) Lipoproteins from the Hemolymph and Ovaries of Marine Invertebrates. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 7: 187-207.

- Lee R. F. y Puppione D. L. (1978) Serum Lipoproteins in the Spiny Lobster, *Panulirus interruptus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 59B: 239-243.
- Lee R. F. y Puppione D. L. (1988) Lipoproteins I and II from the Hemolymph of the Blue Crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II Associated with Vitellogenesis. *J. Exp. Zool.* 248: 278-289.
- Mathews C. K. y van Holde K. E. (1990) *Biochemistry*. pp. 1129. The Benjamin/Cummings Publishing company, Inc. Redwood City, CA, USA.
- Mc Donald H. J. y Ribeiro L. P. (1959) Ethylene and Propylene Glycol in the Pre-staining of Lipoproteins for Electrophoresis. *Clin. Chim. Acta.* 4: 458-459.
- Microsoft Corporation (1994) MICROSOFT EXCEL, versión 5.0a. Microsoft Corporation.
- Microtec International (1990) IMAGESTAR. Microtec International Inc, Itsinchu, TAIWAN.
- Mourente G., Medina A., González S. y Rodríguez A. (1994) Changes in Lipid Class and Fatty Acid Contents in the Ovary and Midgut Gland of the Female Fiddler Crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiadae) During Maturation. *Mar. Biol.* 121: 187-197.
- Muriana F. J. G., Ruiz-Gutiérrez V., Gallardo-Guerrero M. L. y Minguez-Mosquera M. I. (1993) A Study of the Lipids and Carotenoprotein in the Prawn, *Penaeus japonicus*. *J. Biochem.* 114: 223-229.
- Nelson G. J. (1972) Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, Composition and Metabolism. En *Quantitative Analysis of Blood Lipids*. pp. 25-73. (Edited by Nelson G. J.), Wiley-Interscience, New York.
- Pollero R. J., González-Baró M. R. y Garín C. (1992) Lipid Transport in Snails, Partial Characterization of a High-Density Lipoprotein Isolated from *Ampullaria canaliculata* Plasma. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 717-720.
- Rees J. F., Cure K., Piyatiratitivorakul S., Sorgeloos P. y Menasveta P. (1994) Highly Unsaturated Fatty Acid Requirements of *Penaeus monodon* Postlarvae: An Experimental Approach Based on Artemia Enrichment. *Aquaculture*. 122 (2/3): 193-207.

- Reigh R. C. y Stickney R. R. (1989) Effects of Purified Dietary Fatty Acids on the Fatty Acid Composition of Freshwater Shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 77: 157-174.
- Rosenberri B. (1991) World Production of Farm Raised and Captured. *World Shrimp Farming* 16: 13-15.
- Schiefer S. y Beutler H. O. (1985) Phospholipids. In Methods of Enzymatic analysis Vol. VIII, pp. 87-103. (Editado por Bergmeyer), Hans Ulrich, Federal Republic of Germany.
- Sea Food LEADER. (1994) White Shrimp. (March/April): 235-248.
- SEMARNAP. Secretaría del Medio Ambiente de Recursos Naturales y de Pesca. (5 de Marzo de 1996) Superan Meta Camaronera. *Imparcial*: 1/E.
- Shen S. S., Chen S. J. y Huang Y. S. (1994) Effect of Dietary Lipid Levels on the Growth Response to Tiger Prawn, *Penaeus monodon*. *J. Fish. Soc. Taiwan*: 205-213.
- Shimizu S., Tani Y., Yamada H., Tabada M. y Murachi T. (1980) Enzymatic Determination of Serum-Free Fatty Acids: A Colorimetric Method. *Analytical Biochemistry*. 107: 193-198.
- Siedel J., Schlumberger H., Klose S., Ziegenhorn J. y Wahlefeld A. W. (1981) Reagent for the Enzymatic Determination of Serum Total Cholesterol. *J. Clin. Chem. Biochem.* 19: 838.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. y Klenk D. C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*. 150: 76-85.
- Sonnenwirth A. C. y Jarett L. (1986) Métodos de Diagnóstico Clínico. In Lípidos y Lipoproteínas (Edited by Widman S. W.), Octava Edición, pp. 247-251. Editorial Panamericana. México, D.F.
- Sotelo M. R. R. (1993) Aislamiento y Caracterización Parcial de la Lipoproteína en la Hemolinfa del Camarón Blanco (*Penaeus vannamei* Boone) Tesis CIAI), Hermosillo, Sonora, México.

- Spaziani E., Havel R. J., Hamilton R. L., Hardman D. A., Stoudemire J. B. y Watson R. D. (1986) Properties of Serum High-Density Lipoproteins in the Crab, *Cancer antennarius* Stimpson. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 307-314.
- Spaziani E. y Wang W. L. (1991) Serum High Density Lipoproteins in the Crab, *Cancer antennarius* III. Density Gradient Profiles and Lipid Composition of Subclasses. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 555-561.
- Stratakis E., Fragkiadakis G. y Carpelis M. E. (1992) Isolation and Characterization of a Non Sex-Specific Lipoprotein from Hemolymph of Fresh Water Crab *Potamon potamios*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 373: 665-677.
- Teshima S. y Kanazawa A. (1971) Biosynthesis of Sterols in the Lobster, *Panulirus japonicus*, the Prawn, *Penaeus japonicus*, and the Crab, *Portunus trituberculatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 38B: 597-602.
- Teshima S. y Kanazawa A. (1979) Lipid Transport Mechanism in the Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45: 1341-1346.
- Teshima S. y Kanazawa A. (1980) Lipid Constituents of Serum Lipoproteins in the Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46: 57-62.
- Teshima S. y Kanazawa A. (1983) Digestibility of Dietary Lipids in the Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49: 963-966.
- Teshima S. y Kanazawa A. (1986) Nutritive value of Sterols for the Juvenile Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52:1417-1422.
- Teshima S., Kanazawa A. y Kakuta Y. (1986a) Effects of dietary Phospholipids on Growth and Body Composition of Juvenile Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52: 155-158.
- Teshima S., Kanazawa A. y Kakuta Y. (1986b) Effects of Dietary Phospholipids on Lipid Transport in the Juvenile Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52: 159-163.
- Teshima S., Kanazawa A. y Kakuta Y. (1986c) Role of Dietary of Phospholipids in the Transport of ¹⁴C-Tripalmitin in the Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52:519-524.
- Teshima S., Kanazawa A. y Kakuta Y. (1986d) Role of Dietary Phospholipids in the Transport of ¹⁴C-Cholesterol in the Prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52: 719-721.

- Tietz N. W. (1972) Lípidos. En Química Clínica Moderna (Edited by Dryer R. L.), pp. 307-371. Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México, D.F.
- Tsai D. F., Hoa-Chia C. y Tsai C. F. (1984) Total Lipid and Cholesterol Content in the Blue Crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 27-31.
- Ulrich K. (1994) Lipids. En Comparative Animal Biochemistry. Vol. Cap. 15. pp. 562-656. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Van Heusden M. C., Yepiz-Plascencia G. M., Walker A. M. y Law J. H. (1996) *Manduca sexta* Lipid Transfer Particle: Synthesis by Fat Body and Occurrence in Hemolymph. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 39-51.
- Vargas-Albores F., Guzmán M. A. y Ochoa J. L. (1993) An Anticoagulant Solution for Haemolymph Collection and Prophenoloxidase Studies of Penaeid Shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303.
- Vazquez-Boucard C., Galois R. y Ceccaldi H. J. (1989) Variations Circadiennes des Lipides et Lipoprotéines de L'Hémolymph, et des Lipides de L'Hépatopancréas, Chez la Crevette *Penaeus japonicus*. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 97: 87-93.
- Wahlfeld A. W. (1974) Triglycerides. Determination after Enzymatic Hydrolysis. *Methods of Enzymatic Analysis.* 4: 1831- 1835.
- Wallaert C. y Babin P. J. (1995) Frozen Storage Affects High Density Lipoproteins and the Quantitation of Trout *Oncorhynchus mykiss* Lipoprotein Classes as Separated by Ultracentrifugation. *Comp. Biochem. Physiol.* 110B: 439-444.
- Wang S. y Zhou H. (1993) Nutritional Requirement of *Penaeus orientalis* for Linoleic Acid and Linolenic Acid. *J. Fisheries of China.* 17: 1-6.
- Yepiz-Plascencia G. M., Sotelo-Mundo R., Vazquez-Moreno L., Ziegler R. e Higuera-Ciajara I. (1995) A non-sex-Specific Hemolymph Lipoprotein from the White Shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and Partial Characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B: 181-187.
- Young N. J., Quinlan P. F. y Goad L. J. (1992) Cholesterol Esters in the Decapod Crustacean *Penaeus monodon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 761-768.

- Zhou H. y Wang Y. (1991) Nutritional Requirements in Cholesterol and Phospholipids for the Chinese Prawn (*Penaeus orientalis*). J. Fish China-Shuichan-Xuebao. Abstracts. 15: 148-154.