

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSGRADO



"DETERMINACION DE GLUTATION PEROXIDASA
SELENIO DEPENDIENTE EN CAMARON BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*, Bonne) EN CONDICIONES
DE LABORATORIO."

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS ALIMENTICIOS
Y PRODUCCION ACUICOLA

PRESENTA
BEATRIZ ELENA PONCE AMÉRIZ

SAN PEDRO GARZA GARCIA, N. L. DICIEMBRE 2004

TM

Z5 320

FCB

2004

. P6

BEATRIZ ELENA PONCE AMBRIZ



1020145883

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSGRADO**



**“DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN PEROXIDASA SELENIO
DEPENDIENTE EN CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*,
Bonne) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.”**

**TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN RECURSOS ALIMENTICIOS Y PRODUCCION
ACUICOLA**

PRESENTA:

BEATRIZ ELENA PONCE AMBRIZ

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L.

DICIEMBRE, 2004.

98678

TM
25.0
FCB
2064
.P₆



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO**



**“DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN PEROXIDASA SELENIO DEPENDIENTE EN CAMARÓN
BLANCO (*Litopenaeus vannamei*, Bonne) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.”**

**TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN RECURSOS ALIMENTICIOS Y
PRODUCCION ACUICOLA**

PRESENTA:

ING. BEATRIZ ELENA PONCE AMBRIZ

A handwritten signature in black ink, appearing to read "D. Ricque Marie", written over a horizontal line.

**DR. DENIS RICQUE MARIE
PRESIDENTE**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Nieto Lopez", written over a horizontal line.


**DRA. MARTH G. NIETO LOPEZ
SECRETARIO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "L. Cruz Suarez", written over a horizontal line.

**DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUAREZ
VOCAL**

APROBACIÓN

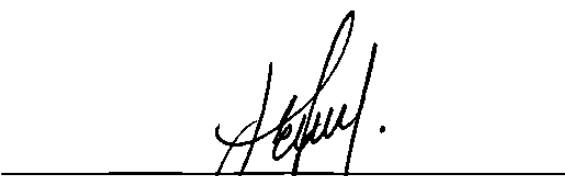
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la C. Ing. en Ac. Beatriz Elena Ponce Ambriz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Recursos Alimenticios y Producción Acuícola.



DR. DENIS RICQUE MARIE
PRESIDENTE



DRA. MARTHA G. NIETO LOPEZ
SECRETARIO



DRA. L. ELIZABETH CRUZ SUAREZ
VOCAL

San Nicolás de los Garza, N.L.

Diciembre, 2004

DEDICATORIA.

A Dios.

A mis padres.

A mi esposo David.

A mis hijos: David Armando, Frida Natalia e Itzel Valeria.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez y al Dr. Denis Ricque Marie, Fundadores de la Maestría en el Programa Maricultura y directores de este trabajo.

A la Dra. Jane Wyatt y a la MC Juana Ma. Meléndez, del CIAD, AC Hermosillo, así como a el Dr. Benito David Mata Cárdenas, del CIBIN, IMSS, Monterrey.

A mis maestros: Dra. Elizabeth Cruz Suárez, Dr. Denis Ricque Marie, Dra. Leticia Háuad M., Dr. Rahim Foroughbakhch, Dr. Roberto Mendoza A., Dra. Graciela García Díaz, Dr. Guillermo Compean y al Dr. Ramón Pacheco.

A mis compañeros y amigos en Maricultura: Ing. Oscar M. Loaiza J. y a su esposa Sara, MC. David Montaña A., MC Gerardo Cruz, MC Lourdes Castillo, Dra. Mireya Tapia, Dra. Martha G. NietoLópez, Dr. Jesús Montemayor, Dr. Carlos Aguilera y especialmente a Lic. Adriana García, Asistente del programa Maricultura.

INDICE.

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE ESQUEMAS.....	vi
INDICE DE GRAFICAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
I. ANTECEDENTES.....	1
I.1. Requerimientos nutricionales.....	2
I.1.1. Proteínas.....	2
I.1.2. Aminoácidos.....	3
I.1.3. Carbohidratos.....	3
I.1.4. Energía.....	3
I.1.5. Vitaminas.....	4
I.1.6. Minerales.....	5
I.1.7. Lípidos.....	5
II. HIPÓTESIS.....	12
III. OBJETIVO GENERAL.....	12
III.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
IV. MÉTODOS.....	13
V. METODOLOGÍA.....	13
V.1. Capacitación en el CIAD, AC de Hermosillo Sonora.....	13
V.2. Laboratorio de Maricultura, FCB UANL; habilitación.....	15
V.2.1. Preparación de reactivos y búferes.....	15
V.2.2. Material biológico.....	16
V.2.3. Obtención de los homogenizados.....	18
V.2.4. Obtención de los extractos enzimáticos.....	20
V.2.5. Cinéticas enzimáticas.....	22
V.2.6. Determinación de proteína.....	23
V.2.7. Análisis estadísticos.....	23
VI. RESULTADOS.....	25
VI.1. Efecto temperatura.....	25
VI.2. Efecto tiempo.....	27
VI.3. Efecto congelación.....	30
VI.4. Efecto dieta.....	32
VI.4.1. Efecto dieta, con eliminación de valores extremos.....	32

VI.4.2. Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos.....	36
VI.4.3. Proteína.....	38
VII. DISCUSIÓN.....	39
VII.1. Efecto temperatura.....	39
VII.2. Efecto tiempo y efecto congelación.	39
VII.3. Efecto Dieta.....	40
VIII. CONCLUSIONES.....	41
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	42
X. ANEXOS	45
Anexo 1.....	46
Anexo 2.....	49
Anexo 3.....	50
Anexo 4.....	51
Anexo 5.....	54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Requerimientos vitamínicos.....	4
Tabla 2.	Requerimientos minerales.....	5
Tabla 3.	Clasificación de los lípidos.....	6
Tabla 4.	Características de los radicales libres (Adaptado de Yu, 1994).....	9
Tabla 5.	Defensa celular.....	10
Tabla 6.	Composición de las Dietas Experimentales.....	17
Tabla 7.	Factorial efecto temperatura.....	25
Tabla 8.	Efecto de la temperatura por extracto.....	27
Tabla 9.	Factorial efecto tiempo.....	28
Tabla 10.	Efecto del tiempo entre la obtención de los extractos y su cinética.....	28
Tabla 11.	Factorial efecto de la congelación.....	30
Tabla 12.	Efecto de la congelación en los extractos.....	30
Tabla 13.	Factorial efecto de las dietas.....	32
Tabla 14.	Efecto de las dietas por extracto, eliminando valores extremos.....	34
Tabla 15.	Efecto de las dietas por extracto, sin eliminar valores extremos.....	36
Tabla 16.	Efecto de las dietas en la cantidad de proteína soluble por extracto.....	38

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Mecanismo de oxidación.....	7
Esquema 2.	Peroxidación lipídica.....	8
Esquema 3.	Hidroperoxidación.....	9
Esquema 4.	Defensa celular.....	11
Esquema 5.	Obtención de datos de los organismos.....	18
Esquema 6.	Obtención de los homogenizados.....	19
Esquema 7.	Obtención de los extractos.....	21
Esquema 8.	Congelación.....	22

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1.	Efecto de la temperatura sobre los extractos.....	26
Gráfica 2.	Efecto de la temperatura sobre el extracto ojo	26
Gráfica 3.	Efecto de la temperatura sobre el extracto hepatopáncreas	26
Gráfica 4.	Efecto de la temperatura sobre el extracto músculo	27
Gráfica 5.	Efecto tiempo sobre los extractos.....	28
Gráfica 6.	Efecto tiempo sobre el extracto ojo.	29
Gráfica 7.	Efecto tiempo sobre el extracto hepatopáncreas.	29
Gráfica 8.	Efecto tiempo sobre el extracto músculo.	29
Gráfica 9.	Efecto congelación sobre los extractos.....	31
Gráfica 10.	Efecto congelación sobre el extracto ojo.	31
Gráfica 11.	Efecto congelación sobre el extracto hepatopáncreas.....	32
Gráfica 12.	Efecto congelación sobre el extracto músculo.	32
Gráfica 13.	Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre los extractos.....	34
Gráfica 14.	Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre el extracto ojo.	34
Gráfica 15.	Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre el extracto hepatopáncreas.	35
Gráfica 16.	Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre el extracto músculo.	35
Gráfica 17.	Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre los extractos.....	37
Gráfica 18.	Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre el extracto ojo.	37
Gráfica 19.	Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre el extracto hepatopáncreas.	37
Gráfica 20.	Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre el extracto músculo.	37
Gráfica 21.	Efecto dieta sobre la proteína de los extractos.	38

ABREVIATURAS.

%	Por ciento
™	Marca registrada
®	Marca registrada
μ	Micro
$\Delta_{A340nm/min}$	Valor de la pendiente a 340 nanómetros por minuto
(P)	Probabilidad
°	Grados
°C	Grados centígrados
μg/ml	Microgramo por mililitro
μl	Microlitros
<i>ad libitum</i>	A saciedad
CIAD, AC	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Asociación Civil
CIBIN, IMSS	Centro de Investigación Biomédicas del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social
ciclos/min	Ciclos por minuto
cm	Centímetro
cms	Centímetros
Co.	Company (compañía)
Cu	Cobre
Da	Daltons
Dr. Dra.	Doctor, Doctora
EDTA	Ácido etil-n-diamin tetra-acético
<i>et al.</i>	Y colaboradores
ETQ	Ethoxyquin (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,-trimethylquinoline)
Ext	Extracto o extractos
g	Gramo o gramos
GSH	Glutación reducido
GSH-Rx	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
h	Horas
HPCH	Harina De Pescado Chilena, Tepual
HSAAO	Harina De Subproducto De Atún Altamente Oxidada
HSAMO	Harina De Subproducto De Atún Medianamente Oxidada
Inc.	Incorporated (incorporado)

Ind.	Industrial (industria)
Ing.	Ingeniero
Ing. Pesq.	Ingeniero Pesquero
ITESM	Instituto Tecnológico De Estudios Superiores De Monterrey
KCL	Cloruro de potasio
lt	Litro o litros
M	Molar
M. C.	Maestro (a) en Ciencias
MA	Massachussets
mg	Miligramo o miligramos
mg prot	Miligramos de proteína
mg/kg	Miligramos por kilogramos
min	Minuto o minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NADP	β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidiced form
NADPH	β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form
nm	Nanómetros
no.	Número
OCExF	Órgano Congelado Extracto Fresco
OFExC	Órgano Fresco Extracto Congelado
OFExF	Órgano Fresco Extracto Fresco
ox	Oxidado
Oxid	Oxidada u oxidación
rx	Reacción
Se-GPx	Glutación Peroxidasa Selenio Dependiente
seg	Segundo o segundos
St.	Saint (San)
Sub-p	Subproducto
T°C	Temperatura en grados centígrados
Tiem	Tiempo
U.S.A.	Estados Unidos De América
UE	Unidad enzimática
UE/mg prot	Unidad enzimática por miligramo de proteína
UE/ml	Unidad enzimática por mililitro
UV/VIS	Ultra violeta y luz visible
vol.	Volumen o volúmenes
vs	<i>Versus</i> (contra)
xg	Gravedades

RESUMEN.

Por ser el sistema de glutatión reductasa la defensa vital contra la peroxidación en mamíferos, se ha empezado a estudiar recientemente ésta en las especies acuáticas. Actualmente se sabe que en el tejido muscular de varias especies de agua dulce (carpa, bagre y mejillón) existe actividad de glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. También se conoce la existencia de glutatión S-transferasa en invertebrados marinos como en el mejillón *Mytilus edulis* y en la almeja *Anadara granosa*, pero no así de la existencia de glutatión peroxidasa selenio dependiente en algunas especies marinas, menos aún en camarón.

En el presente trabajo se propone investigar actividades enzimáticas de glutatión peroxidasa selenio dependiente en músculo con cáscara, en hepatopáncreas y en ojos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

Después de haber confirmado la existencia de glutatión peroxidasa selenio dependiente (**Se-GPx**) en camarón, a través de una estancia en el CIAD AC de Hermosillo, se montó esta técnica en el Laboratorio de Maricultura de la UANL, en colaboración con el CIBIN, IMSS. Este método utiliza H_2O_2 como sustrato y se mantiene constante la concentración de glutatión reducido (GSH) mediante el suministro exógeno de la enzima glutatión reductasa (GSH red) y del NADPH, los cuales convierten el glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH), midiéndose la velocidad de formación del GSSG siguiendo la disminución en la absorbancia de la mezcla a 340nm como NADPH que se convierte a NADP.

Se definió la distribución de **Se-GPx** en diferentes tejidos de camarón y el efecto de diferentes variables del tratamiento de muestras antes y durante la determinación. Para cada variable estudiada, se trabajó con un lote de 4 camarones y cada cinética se hizo por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de análisis de varianza factoriales seguidos de pruebas de comparación múltiple de medias de Duncan ($p < 0.05$).

Los resultados demuestran que en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, la mayor actividad de la **Se-GPx** se encuentra en el hepatopáncreas, seguida por la actividad en ojo y finalmente en músculo (con cáscara).

Se demostró que si la temperatura de la muestra sube, durante la cinética, por arriba del nivel recomendado de 25°C, los resultados cambian significativamente a partir de los 28°C, por lo que el control de la temperatura es un factor importante que se debe monitorear.

Se mostró que la actividad de la enzima en los extractos de los tejidos analizados, conservados a 0°C, disminuye significativamente si se almacenan por más de 10 horas antes de ser analizados. Al analizar extractos congelados o extractos frescos, obtenidos de hepatopáncreas, ojo y músculo (con cáscara) frescos o congelados, se encontró que la actividad disminuye significativamente sólo en hepatopáncreas cuando los extractos son congelados, pero no cuando se trabaja con el órgano congelado. En el caso de los ojos no hay diferencia cuando se trabaja con el extracto congelado pero sí cuando se trabaja con el órgano congelado ya que en este caso la actividad aumenta. Los resultados en músculo (con cáscara) no demostraron diferencias significativas en ninguna de las modalidades evaluadas. Lo que indica que a una temperatura de congelación en hepatopáncreas y en ojo persiste cierta actividad enzimática de otras enzimas que modifican la actividad o presencia de la **Se-GPx**, y que por lo tanto hay que trabajar estas muestras frescas, sin congelar.

SUMMARY.

Because the glutathion reductase system is the most important defence system against peroxidation in mammals, this system is now also being studied in aquatic species. To date, it is known that the muscle tissues of fresh water species (carp, catfish and common mussel) also display glutathion peroxidase and glutathion S-transferase activity. Glutathion S-transferase activity has also been shown in marine invertebrates such as the edible mussel *Mytilus edulis* and the clam *Anadara granosa*, but selenium dependent glutathion peroxidase has not yet been studied in many marine species and even less in shrimp.

The present work investigated the enzymatic activity of glutathion peroxidase in abdomen, hepatopancreas and eye of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

After having confirmed the existence of selenium dependent glutathion peroxidase (**Se-GPx**) in shrimp at CIAD, Hermosillo, the technique was employed in the laboratory of the Programa Maricultura, UANL in collaboration with CIBIN, IMSS. The method employed H_2O_2 as substrate, while maintaining the concentration of glutathion reductase (GSH) constant by externally adding the enzyme glutathion reductase (GSH red) and NADPH, which convert oxidized glutathion (GSSG) to it's reduced form (GSH), and measuring the rate of GSSG formation by monitoring the reduction in absorbance of the reaction at 340nm, like NADPH which converts to NADP.

The distribution of **Se-GPx** in the different tissues of shrimp was confirmed and the effect of different treatments of the samples before and during the determination. For each variable studied, 4 shrimp were used and each kinetic curve determined in triplicate. The results were analysed statistically using factorial analysis of variance followed by Duncan's multiple comparison of the means ($p < 0.05$).

The results showed that in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, greatest activity of **Se-GPx** is found in the hepatopancreas, followed by the eye and finally the abdomen.

It was found that if the temperature of the sample was raised during the reaction to above the recommended level of 25°C, the results changed significantly starting from 28°C, making temperature control the most important factor to be monitored.

A further change was that enzyme activity in the tissue extracts, conserved at 0°C, reduced significantly when they were stored for more than 10 hours before being analysed. When analysing frozen and fresh extracts obtained from the hepatopancreas, eyes and abdomen, enzyme activity reduced significantly only in the hepatopancreas when the extracts were frozen, but not when working with frozen whole organ. In the case of the eyes, no difference was found when working with frozen extract, but when the frozen whole organ was used, enzyme activity increased. Results for the abdomen did not display significant differences between the different treatments evaluated. This indicates that when freezing the hepatopancreas and eye, a certain activity of other enzymes persists, which modifies the activity or presence of **Se-GPx**. It is therefore important to work with fresh, non-frozen samples.

I. ANTECEDENTES.

Hasta ahora se conoce el sistema de defensa con el que cuentan las células de los organismos terrestres en contra de la producción de radicales libres o de la peroxidación (Yu, 1994), constando de:

I. Sistema de defensa primario.

A. Antioxidantes.

1. Vitamina E.
2. Vitamina C.
3. Vitamina A.
4. Sistema Glutación.
5. Acido úrico.

B. Enzimas antioxidantes.

1. Superóxido dismutasa.
2. Catalasa.
3. Glutación peroxidasa.

II. Sistema de defensa secundario.

A. Enzimas lipolíticas.

B. Enzimas proteolíticas.

Pero aún no se han estudiado ampliamente la existencia de éstos en organismos acuáticos.

Actualmente se sabe que en el tejido muscular de peces de agua dulce existe actividad de glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa demostrado en carpa (George *et al.*, 1989), en bagre (Gallagher *et al.*, 1992) y en mejillón de agua dulce *Sphaerium corneum* (Boryslawskyj *et al.*, 1988).

También se conoce la existencia de glutatión S-transferasa en invertebrados marinos como en el mejillón *Mytilus edulis* (Lee, 1988; Viarengo *et al.*, 1991; Livingstone *et al.*, 1992) y en almeja *Anadara granosa* (Patel *et al.*, 1990).

Pero no así de la existencia de glutatión peroxidasa selenio dependiente en éstas especies marinas, menos aún en camarón.

Considerando la importancia que el cultivo de ésta especie ocupa dentro de la economía del país como generador de divisas, siendo uno de los principales productos de exportación

(SEPESCA, 1994), y al mismo tiempo la importancia de la calidad de los alimentos balanceados para camarón y las implicaciones sanitarias (Chamberlain, 1995 *op cit*) que pudieran influir en la salud de ésta especie por deterioro lipídico en el alimento es necesario estudiar los mecanismos de defensa con los que cuentan los camarones Peneidos, en especial *Litopenaeus vannamei*, ya que conociéndolos se podrán orientar las acciones para prevenir las enfermedades y mortalidades que pudieran afectar, de esta forma, al cultivo y repercutir en los rendimientos económicos de éste.

I.1. Requerimientos nutricionales.

La nutrición de peces y crustáceos se ha convertido en una de las áreas de investigación y desarrollo más importante de la acuicultura. El desarrollo de un régimen de alimentación requiere del entendimiento básico de la nutrición, así como de los requerimientos nutricionales de los animales, que se consideran bajo los siguientes grupos de nutrientes.

I.1.1. Proteínas.

Las proteínas se consideran como el constituyente más importante en las células vivas (Tacon, 1989 *op. cit.*) desempeñan funciones biológicas en el organismo, entre las que se cuenta principalmente la regeneración y la formación de tejidos, síntesis de enzimas, anticuerpos y hormonas, y como constituyente de la sangre; forman parte del tejido conectivo y muscular (Badui, 1993), son grandes moléculas constituidas por aminoácidos.

I.1.2. Aminoácidos.

Los aminoácidos (A.A.) desempeñan un papel importante en el metabolismo celular, todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por enzimas constituidas por residuos de A.A.. Estos son esenciales para el metabolismo lipídico y de carbohidratos, para la síntesis de proteína tisular y de otros compuestos, así como fuente metabólica de energía (Tacon, 1993).

I.1.3. Carbohidratos.

Forman la fuente principal de energía química necesaria para los animales. Los carbohidratos incluyen azúcares simples o monosacáridos, los disacáridos y polisacáridos; en estos últimos están los almidones, siendo la forma en que se almacenan los carbohidratos en plantas, mientras que en los animales es en glucógeno (Akiyama, *et al.* 1994).

Los peces y crustáceos no están exentos de tomar la energía de estos componentes, ya que la energía necesaria para un organismo depende de la etapa del ciclo biológico en la que se encuentra, de la estación y de las condiciones medio ambientales. Así se tiene que un organismo necesitará más energía por unidad de peso en sus etapas iniciales que un adulto, al igual que la temperatura ambiental será un efecto determinante en la velocidad metabólica de los organismos poiquilotermos (Rodríguez-Marín, 1993).

I.1.4. Energía.

Las fuentes de energía de una dieta son las proteínas, los lípidos y los carbohidratos, utilizando los organismos acuáticos principalmente las proteínas como fuente de energía, por lo que es recomendable utilizar en las dietas carbohidratos altamente digeribles para que las proteínas sean utilizadas en el crecimiento y al mismo tiempo disminuir el costo del alimento (Rodríguez-Marín, *op. cit.*).

I.1.5. Vitaminas.

Las vitaminas son compuestos orgánicos requeridos en cantidades traza por peces y crustáceos para el mantenimiento de sus procesos metabólicos. Se han identificado, hasta ahora, 15 vitaminas como indispensable, de las cuales se ha hecho una revisión especial para camarón (Tacon, 1991):

Tabla 1. Requerimientos vitamínicos.

Fuente Vitaminas	Akiyama & Dominy, 1989	Tacon, 1987	Hoffmann - LaRoche, 1987	Kanazawa, 1985
Tiamina	50 mg/k	66 mg/k	30-60 mg/k	(HCl) 120 mg/k
Riboflavina	40 mg/k		20-40 mg/k	40 mg/k
Piridoxina	50 mg/k		150-250 mg/k	(HCl) 120 mg/k
Ac. pantoténico	75 mg/k	220 mg/k		
Calcio pantotenato				100 mg/k
Niacina	200 mg/k			
Ac. nicotínico		330 mg/k		150 mg/k
Biotina	1 mg/k	0.54 mg/k	0.8-1.5 mg/k	1 mg/k
Inositol	300 mg/k	1,500 mg/k	400-600 mg/k	4,000 mg/k
Colina	400 mg/k	2,400 mg/k	400-600 mg/k	
Cloruro de colina				1,200 mg/k
Ac. fólico	10 mg/k	12 mg/k	10-15 mg/k	5 mg/k
Cianocobalamina	0.1 mg/k	0.084 mg/k	0.02-0.05 mg/k	0.02 mg/k
Vitamina C	100 mg/k	1,500 mg/k	2,000-3,000 mg/k	(A. S.) 5,000 mg/k
Vitamina A	10,000 IU/k	8,000 IU/k	4,000-10,000 IU/k	5,000 IU/k
Vitamina D ₃	5,000 IU/k	2,400 IU/k	4,000-2,000 IU/k	1,000 IU/k
Vitamina E	300 mg/k	240 mg/k	100-200 mg/k	200 mg/k
Vitamina K	5 mg/k	10 mg/k	40-100 mg/k	40 mg/k

I.1.6. Minerales.

Una gran cantidad de minerales sirven como componentes estructurales en los tejidos duros, como los huesos, y como componentes de otros tejidos, como es el caso del azufre en las proteínas. También se han visto como componentes en las metaloproteínas y sirven como cofactor y/o activador de una gran variedad de enzimas; la mayoría de los minerales solubles, como el calcio, fósforo, sodio, potasio y el cloro funcionan en la osmo-regulación, en el balance ácido-básico y en la producción de membranas potenciales (Davis and Gatlin III, 1991 *op cit*).

Davis y Gatlin III (*op. cit*) realizaron una revisión bibliográfica de lo que se ha hecho hasta ahora para saber los requerimientos minerales de organismos con interés en acuicultura, de los cuales sólo destacaremos los relacionados a la camaronicultura:

Tabla 2. Requerimientos minerales.

Mineral	Especie	Suplementación recomendada g/100g	Nivel de suplementación evaluado g/100g	Referencia
Calcio	P. japonicus	Indispensable	0, 1, 2	Deshimaru & Yone, 1978
		1.2	0.024, 0.39, 1.20, 1.99, 2.20	Kitabayashi <i>et al.</i> , 1971
		1.0, 2.0	0.53, 1.06, 2.11	Kanazawa <i>et al.</i> , 1984
	L. vannamei	Indispensable	0, 1, 2, 3, 4 con 0, 0.5, y 1.2% de P	
Fósforo	P. japonicus	2.0	0, 1, 2, 3, 4	Deshimaru & Yone, 1978

I.1.7. Lípidos.

La palabra lípido proviene del griego *lipos*, que significa grasa y cuya aplicación no ha sido establecida correctamente, originalmente se definía como “una sustancia insoluble en agua pero soluble en disolventes orgánicos”; en la tabla 3 se observa la clasificación existente hasta ahora de los lípidos.

Tabla 3. Clasificación de los lípidos.

Clasificación	Nombre	
Lípidos simples	Grasas y aceites	Esteres de glicerol con ácidos monocarboxílicos.
	Ceras	Esteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos.
Lípidos compuestos	Fosfolípidos	Esteres conteniendo ácido fosfórico en ves de ácido graso, combinado con una base de nitrógeno.
	Glucolípidos	Compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosinol, llamados también cerebrosidos
	Lipoproteínas	Compuestos de lípidos y proteínas
Compuestos asociados	Acidos grasos	Derivados de los lípidos simples
	Pigmentos	
	Vitaminas liposolubles	
	Esteroles	
	Hidrocarburos	

1.1.7.1. Rol de los lípidos.

Los lípidos constituyen un concentrado y fuente altamente digestible de energía, son una fuente de ácidos grasos esenciales necesarios para el crecimiento y sobrevivencia de todos los animales, sirven como acarreadores de vitaminas liposolubles y de otros compuestos como los esteroles y fosfolípidos, los cuales son esenciales para el funcionamiento metabólico normal en los camarones. La función de los ácidos grasos está relacionada con su rol como componentes en los fosfolípidos y como precursores de las prostaglandinas (Kanazawa, 1984; Akiyama *et al.*, 1991).

Los efectos benéficos de los fosfolípidos en el crecimiento y la sobrevivencia del camarón están bien documentadas (Cruz Suárez *et al.*, 1992).

1.1.7.2. Requerimientos lipídicos en organismos acuáticos.

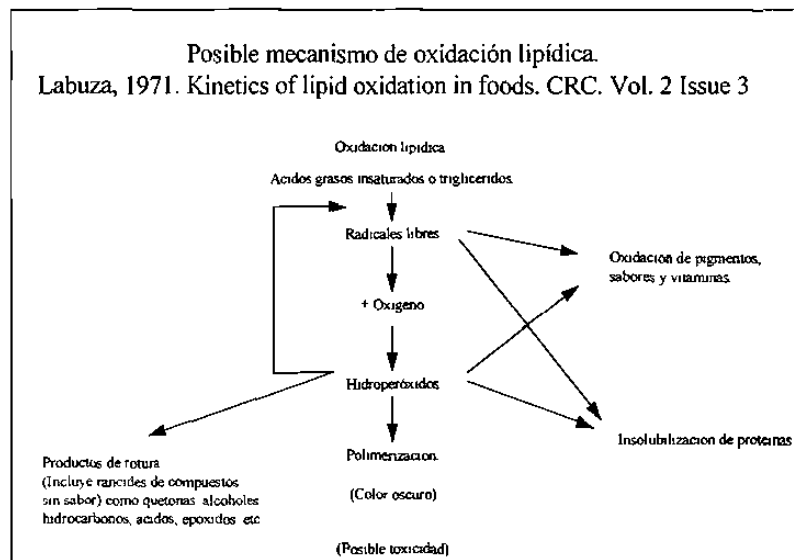
Estudios conducidos durante las dos últimas décadas han demostrado que el requerimiento de ácidos grasos esenciales varía entre las diferentes especies de organismos acuáticos y que difiere de aquel de los animales de sangre caliente. El requerimiento de ácidos grasos esenciales probablemente está estudiado en forma más extensa en la trucha arco iris (*Onchorynchus mikiss*). Se ha demostrado que los ácidos grasos ω 3 son nutritivamente esenciales

y que el requerimiento puede ser satisfecho cuando la dieta contiene 0.5-10% de los lípidos en forma de ácidos grasos ω_3 de cadena larga contenidos en la harina y / o el aceite de pescado. En el langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) se ha demostrado que sus requerimientos de ω_3 se satisfacen mejor por los ácidos ω_3 contenidos en lípidos de pescado que por el ácido α -linolénico (Opstvedt, 1985).

Estos organismos tienen una capacidad metabólica limitada para poder realizar una elongación de cadenas y desaturación del ácido α -linolénico para transformarlos en ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (Kanazawa, 1984 *op cit*).

1.1.7.3. Oxidación lipídica en los alimentos.

Todos los ácidos grasos poli-insaturados tienen una estructura en común, la presencia de una doble ligadura, particularmente activa con las especies químicas con uno o más electrones impariados (radicales libres). Por lo que el radical lípido es formado al reaccionar con el oxígeno molecular primero, y después se dará una serie de reacciones que darán como resultado la ruptura de la estructura de los ácidos grasos poli-insaturados. A estas reacciones secuenciales se les conoce como peroxidación lipídica (Horton and Fairhurst, 1987)



Esquema 1. Mecanismo de oxidación.

En los alimentos la oxidación de lípidos es sumamente complicada por la presencia de metales, amino ácidos y proteínas con los cuales se encuentran los lípidos en conjunción (Labuza, 1971).

Durante el proceso de auto-oxidación lipídica se forman productos de degradación química incluyendo radicales libres, peróxidos, hidroperóxidos, aldehídos y cetonas, los cuales reaccionan con otros ingredientes de las dietas disminuyendo su valor biológico y disponibilidad durante la ingestión. Bajo esas condiciones el beneficio nutricional es, de hecho, perjudicial a la salud (Tacon, 1989).

1.1.7.4. Química de la peroxidación lipídica.

De forma simplificada, la peroxidación lipídica es denominada como de iniciación, de propagación y de terminación (Horton and Fairhurst, 1987)

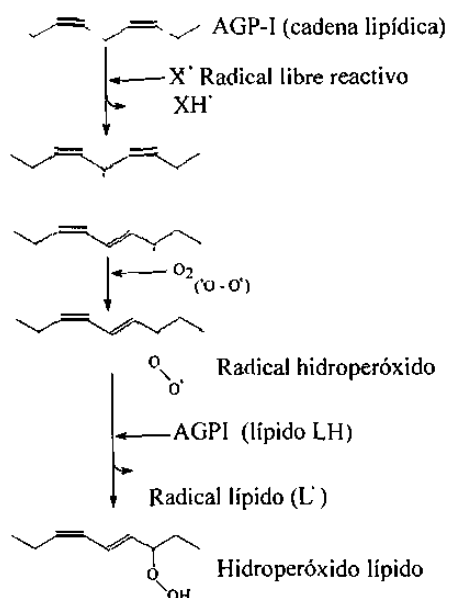
Iniciación	RH	$R + H$	Radical Libre
Propagación	$R\cdot + O_2$	$ROO\cdot$	Radical Hidroperóxido
	$ROO + RH$	$R + ROOH$	Hidroperóxido
Terminación	$R\cdot + R$	RR	Compuestos muy estables
	$R\cdot + ROO\cdot$	$ROOR$	
	$ROO + ROO\cdot$	$ROOR + O_2$	
	$RO\cdot + R\cdot$	ROR	
	$2RO\cdot + 2ROO\cdot$	$2ROOR + O_2$	

Esquema 2. Peroxidación lipídica.

En donde la etapa de iniciación es la reacción de los ácidos grasos poli-insaturados con los radicales libres reactivos para formar el radical lípido, de reaccionar con una molécula de oxígeno, formará un radical peroxilípido.

Durante la propagación se da la reacción del radical peroxilípido con otro ácido graso poli-insaturado dándose un hidroperóxido lípido y un radical lípido, conservándose el número de radicales.

Y en la terminación se da la remoción de los radicales libres, combinándose dos radicales libres y como producto se obtiene un no radical, terminando así la reacción en cadena.



Esquema 3. Hidroperoxidación.

Tabla 4. Características de los radicales libres (Adaptado de Yu, 1994).

Especie	Símbolo químico	Propiedades	Vida promedio a 37°C
Superóxido, anión	O ₂ ^{•-}	Buen reductante, pobre oxidante.	1x10 ⁻⁶
Hidroxil, radical	HO [•]	Extremadamente reactivo (reacciones de adición, abstracción y transferencia de electrones)	1x10 ⁻⁹
Perhidroxil, radical	HO ₂ [•]	Oxidante muy fuerte y tan soluble en lípidos como el superóxido. Probablemente inicia la peroxidación lipídica	
Peroxil, radical	ROO [•]	Habilidad de oxidación baja, comparada con HO [•] , pero de fácil difusión	1x10 ⁻²
Alcoxil, radical	RO [•]	Intermediario en la reacción de los lípidos entre ROO [•] y HO [•]	1x10 ⁻⁶
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Oxidante, pero reacciona con sustratos orgánicos. Alta capacidad de difusión	
Oxígeno, singlete	¹ O ₂	Agente con gran poder de oxidación con tiempo de 10 ⁻⁶ s	1x10 ⁻⁶
Oxígeno molecular	O ₂		> 10 ²

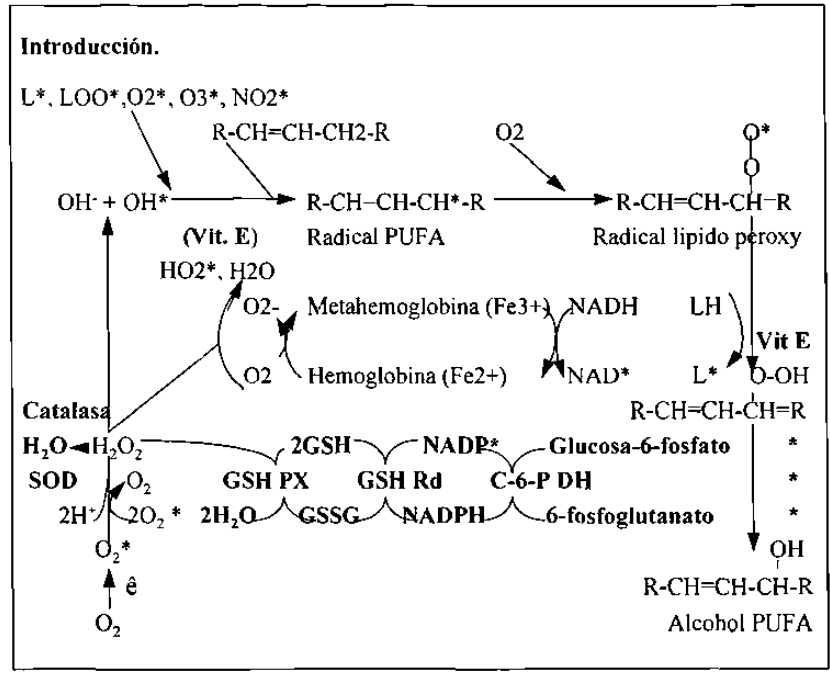
I.1.7.5. Protección contra la peroxidación lipídica.

I.1.7.5.1. Sistemas de defensa.

Tabla 5. Defensa celular.

Categoría	Estructura	Sitio	Acciones
Superóxido dismutasa	Cu/Zn SOD	En el citosol como en el núcleo	Cataliza dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2
	Mn SOD	En mitocondria	
	Cu SOD	En plasma	
Catalasa	Hemoproteína tetramérica	En los peroxisomes	Cataliza la dismutación de H_2O_2 , reduce los hidroperóxidos metil y etil.
GSH, ciclo redox			
GSH peroxidasa	Selenoproteína	En citosol como en mitocondria	Cataliza la reducción de H_2O_2 y otros hidroperóxidos (peróxidos lípidos, productos de lipoxigenasas).
GSH reductasa	Proteína dimérica	En el citosol como en mitocondria	Cataliza la reducción de moléculas disulfido de bajo peso molecular
Compuestos liposolubles			
Vitamina E	Vitamina liposuble	Membranas lipídicas, fluidos extracelulares (incluyendo los alvéolos).	Convierte $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ y radicales lípidos peroxil a formas menos reactivas. Rompe las cadenas de reacción de la peroxidación lipídica.
β-Caroteno	Precursor metabólico de Vit. A	Membranas de tejido.	Remueve $O_2^{\cdot-}$, reacciona directamente con radicales peroxil.
Bilirubina	Producto de catabolismo de hemoproteínas	Tejido sanguíneo	Rompe cadenas antioxidants. Reacciona con ROO^{\cdot}
Compuestos hidrosolubles.			
Vitamina C	Vitamina hidrosoluble	Amplia distribución fluidos intra y extracelulares.	Remueve directamente $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot OH$. Neutraliza oxidantes de neutrófilos estimulados. Contribuye a la regeneración de Vit E.
Ácido úrico	Base purina oxidada	Amplia distribución	Remueve OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$, oxidantes oxoheme y radicales peroxil. Previene la oxidación de Vit C. Liga metales en transición.
Glucosa	Carbohidrato	Amplia distribución	Remueve $\cdot OH$.
Cisteína	Amino ácido	Amplia distribución	Reduce varios componentes orgánicos por donación de electrones de grupos sulfidrilos.
GSH	Tripéptido	Intracelular como alveolar	Como sustrato en el ciclo redox de GSH, reacciona directamente con $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ y radicales libres orgánicos.

(Major antioxidants scavenging components. Cellular defence against damage from reactive oxygen species. Yu, 1994)



Esquema 4. Defensa celular

II. HIPÓTESIS.

Los camarones peneidos cuentan con sistemas de defensa contra radicales libres, dentro de los cuales se debe de encontrar la enzima glutatión peroxidasa selenio dependiente (Se-GPx)

III. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la presencia de la enzima glutatión peroxidasa selenio dependiente en órganos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bonne) y variaciones de su actividad en función de factores metodológicos y nutricionales.

III.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Demostrar la existencia de la enzima glutatión peroxidasa selenio dependiente en órganos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bonne) a través de la cinética de formación de GSSG, siguiendo la disminución de la absorbancia de NADPH transformado a NADP usando como sustrato H₂O₂.

Determinar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa selenio dependiente en órganos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bonne) en función de:

- 1.1. Temperatura durante la cinética enzimática (25°, 28°, 30° y 35°C)
- 1.2. Tiempo de conservación del extracto fresco a 0°C
- 1.3. Congelación del extracto enzimático o de la muestra.

Evaluar si existen fluctuaciones en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa selenio dependiente en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bonne) alimentado con dietas conteniendo harinas de pescado con diferentes grados de oxidación.

IV. MÉTODOS.

Método propuesto por Massey & Williams (1965) para la determinación de la actividad en la enzima glutatión reductasa (Sigma, G-4751, type III highly purified from yeast).

Método propuesto por Paglia & Valentine (1967) modificado por Lawrence et al. (1974) para la determinación de la actividad en la enzima glutatión peroxidasa selenio dependiente.

Método propuesto por Lowry (1951) para la determinación de proteína soluble total.

V. METODOLOGÍA.

Con el motivo de montar la técnica para la Determinación de Glutatión Peroxidasa Selenio Dependiente (**Se-GPx**) en el laboratorio de Maricultura de ésta institución, se realizó una estancia de capacitación bajo la supervisión de la Dra. Jane Wyatt y la M. C. Juana Ma. Meléndez en el laboratorio de Minerales del departamento de Nutrición Humana del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (**CIAD, AC**) de Hermosillo, Sonora; México

V.1. Capacitación en el CIAD, AC de Hermosillo Sonora.

Se analizaron muestras de plasma humano, sangre total humana y eritrocitos de borrego, provenientes de otros estudios por lo que eran muestras congeladas y con las cuales se acostumbra trabajar en el laboratorio de Nutrición Humana del CIAD, AC. para poder tener una referencia, y comprobar la reproductibilidad de las cinéticas enzimáticas se utilizó extracto fresco de hígado de rata.

Se tomaron como referencia trabajos coordinados por el Dr. Roger A. Sunde (Department of Human Nutrition, University of Missouri; Columbia Missouri 65211. U.S.A.), los cuales realizó con hígado de rata así como la experiencia de trabajos previos en el CIAD, AC.

Se utilizó una rata hembra anestesiada con éter para extraerle el hígado, el cual fue enjuagado con tres cambios de KCl 0.15M en frío para eliminar los eritrocitos, se realizó un cuarto enjuague en agua destilada.

Por cada 0.5 g, el hígado fue homogenizado en 9 volúmenes de buffer de sucrosa 0.25 M conteniendo EDTA 0.25 mM

Una vez dominada la técnica en éstas muestras, se realizó un preliminar en camarones, donados por el Dr. Holdsmith del ITESM Campus Guaymas en Sonora; con un peso promedio de 11g. Se analizaron músculo (con cáscara), hepatopáncreas y hepatopáncreas + ojo.

En el caso del camarón, no se enjuagó en KCl 0.15M. El hepatopáncreas y el músculo (con cáscara) fueron obtenidos como se describe en la sección V.2.2.1. Disección del material biológico, en cuanto a los ojos éstos fueron cortado en su base; los homogenizados se practicaron igual que con el hígado, por cada 0.5g : 9vol de buffer.

Los homogenizados se realizaron en el laboratorio de Tecnología de los Alimentos de Origen Animal.

Cada homogenizado fue pasado a tubos de centrifugación de policarbonato con capacidad de 50ml, se pesaron en una balanza analítica electrónica de precisión marca A & B, limited Tokyo Japan para igualar en peso su contraparte con agua. Se centrifugaron por 20min a 7,740xg a 4°C en una centrífuga marca Beckman J2-MI rotor JA-20. Este paso se llevó a cabo en el laboratorio de Ciencia de los Alimentos.

En el laboratorio de Nutrición se ultracentrifugó en una máquina Beckman Optima™ TLX rotor TLA-100.2 a 17,000xg por 1h a 4°C, teniendo extremo cuidado al igualar pesos.

Se determinó la actividad de la enzima glutatión reductasa por el método de Massey & Williams (1965), ya que esta es necesaria en la determinación de la enzima glutatión peroxidasa. Se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS (CARY 1. Varian Techtron PTY LTD for Varian Associates. Inc. Mulgrave. Victoria Australia). No fue necesario hacer la reacción de blanco, ya

que la reacción no enzimática de GSSG y NADPH es cero. La enzima fue almacenada pura a 4°C y utilizada en diluciones de 10UE/ml

Para la determinación de **Se-GPx** se corrió el método de Paglia & Valentine (1967) modificado por Lawrence *et al.* (1974). Se llevaron a cabo lecturas de blancos, cada 4-5 cinéticas, teniendo especial cuidado en que éstas empezaran con una absorbancia de 0.6-0.7 y que las pendientes fueran de 0.010-0.018. De no ser así, el NADPH o la GSH-Rx se hacían nuevamente. Las incubaciones se hicieron a 25°C por 5min, las cinéticas se corrieron por 3min a 25°C y un pH7.

Cada Unidad Enzimática es definida como 1µmol de NADPH oxidado por minuto con un coeficiente de extinción molar de 6.22×10^6 .

En la capacitación los resultados se obtuvieron en UE/ml, ya que no se determinaron los miligramos de proteína de los extractos.

Todos los reactivos fueron provenientes de SIGMA (SIGMA Chemical Co. St. Louis, Mo. 63178, USA).

V.2. Laboratorio de Maricultura, FCB UANL; habilitación.

Para montar la técnica en el laboratorio de Maricultura se compraron los reactivos (SIGMA Chemical Co. St. Louis, Mo. 63178, USA) y material de laboratorio necesarios.

V.2.1. Preparación de reactivos y búferes.

Los búferes fueron realizados como marca la técnica (anexos 1, 2, 3 y 4), se utilizó agua destilada deionizada, se pesaron todos los reactivos en una balanza electrónica digital de precisión (A & B, limited Tokyo Japan) modelo ER-182A con resolución de 0.01/0.1g, fueron preparados en matraces de aforación de vidrio Pyrex®, se mantuvieron en agitación constante hasta su disolución en una estufa de agitación Cimarec™ (Barnstead/Thermolyne Corporation, Dubuque, Iowa 52004-0797 U.S.A.) modelo SP46925, el pH se midió con un potenciómetro

ORION (Laboratory Products Division Orion Research Incorporated, Boston Ma. 02129 U.S.A.) modelo 720A.

Cada uno fue guardado en botes Nalgene® (Brand Products, Nalgene Company, a Subsidiary of Sybron Corporation; Rochester, New York 14602-0365 USA) de 150, 250 y 1,000ml, dependiendo de la cantidad preparada. Se almacenaron en refrigeración a 0°C.

En algunos casos fueron almacenados en congelación a -20°C en un congelador Frigidaire® (Withe Consolidate Ind. Cleveland OH 44111 U.S.A., CF 25EWO) modelo R134A en alícuotas, utilizando viales Kimble (Div. of 0-1, modelo 60915-D) de 1dram y en otros casos tubos de microcentrifugación de 1ml marca Eppendorf.

La enzima glutatión reductasa (Sigma, G-4751, type III highly purified from yeast) suspendida en (NH₄)₂SO₄ 3.6M fue dializada por 24h a 4°C con dos cambios de buffer de fosfato de sodio 5mM, pH 7.6 y 1mmol de EDTA para eliminar el (NH₄)₂SO₄ 3.6M y obtener así la enzima pura. La diálisis se realizó con agitación constante y la membrana utilizada con poro de 12,000-14,000 Da (VWR Scientific Spectrum Medical Industries, Inc. 1,100 Rankin Road, Huston Texas). La enzima purificada fue guardada en su mismo frasco ámbar en refrigeración a 4°C.

V.2.2. Material biológico

El material biológico y las dietas fueron proporcionados y utilizados por el Ing. Pesq. Montaña en un bioensayo de crecimiento y digestibilidad de harinas de subproductos de atún con diferentes grados de oxidación en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, el cual fue llevado a cabo en la sala de Zootecnia del programa Maricultura, ubicado en el edificio B de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Las instalaciones cuentan con un circuito cerrado (recirculación del agua); consta de 48 acuarios de fibra de vidrio que miden 60x30x35cms con una capacidad de 60lt cada uno; cada acuario tiene doble fondo cubierto con tela de gasa, y está abastecido por aire y agua marina artificial la cual es renovada 9 veces al día. También se cuenta con 3 tanques de aclimatación y/o preengorda, con dimensiones de 1.4x1.5x0.4mt con una capacidad de 500lt. en donde se continuó

alimentando *ad libitum* con las mismas dietas a los organismos en encierros de 20x40x50cms realizados en poliestireno extruido.

Cuenta además, con 5 tanques de 1,500 lt, 3 son colectores y 2 de almacenamiento que, por gravedad, abastecen de agua a los acuarios. Cada tanque de almacenamiento está equipado con un contactor biológico rotatorio para oxidar el amonio y materia orgánica soluble presente en el sistema. La sala está equipada además con 2 filtros de cartucho, 2 filtros de carbón activado y 2 espumadores. Para mantener la temperatura constante se tiene un sistema cerrado de agua dulce e intercambiador de calor en los tanques reservorios.

Los acuarios cuentan con un sistema de aireación Airlift alimentado por una bomba de aire. Se dispone de todo el material y equipo necesario para determinar la calidad del agua como son: potenciómetro, oxímetro, refractómetro y Kit colorimétrico *Aquarium System®* para la determinación de amonio, nitritos y nitratos.

De las cinco dietas utilizadas por el Ing. Pesq. Montañó en su trabajo de investigación y tesis, sólo se ocuparon cuatro las cuales fueron: Dieta Base (control negativo), Dieta Tepual (HPCH, control externo positivo), Dieta Medianamente Oxidada (HSAMO) y Dieta Altamente Oxidada (HSAAO) preparadas como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 6. Composición de las Dietas Experimentales

Ingredientes	Dieta Base	Dieta HPCH	Dieta HSAMO	Dieta HSAAO
Harina de trigo	45.020	38.422	36.446	35.888
Gluten de trigo	10.030	8.000	8.000	8.000
Pasta de soya	29.196	23.270	23.270	23.270
Lecitina (F100 Central Soya)	9.074	6.802	7.151	7.232
Mezcla vitamínica (INVE)	1.267	1.010	1.010	1.010
Metionina	0.031		0.027	0.025
Antioxidante	0.031	0.026	0.025	0.025
Solvay (INVE I)	0.313	0.250	0.250	0.250
Harina de camarón (Tepual Chile)	5.018	4.000	4.000	4.000
Tepual composito 5		18.220		
Harina de Sub-p de Atún Mediana Oxid			19.820	
Harina de Sub-p de Atún Mediana Oxid				20.300
Total	100.000	100.000	100.000	100.000

* Para estabilizar las dietas se agregaron 250 mg /Kg de ETQ, que es la cantidad utilizada por la Fundación Chile en sus Harinas de pescado.

V.2.2.1. Disección del material biológico.

Los camarones fueron disectados para obtener los extractos:

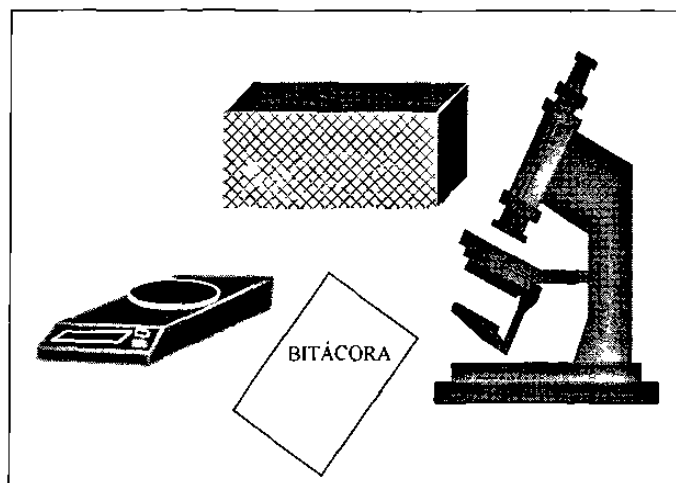
Ojo: se hizo una incisión longitudinal en la base del pedúnculo ocular derecho hasta llegar al izquierdo, se practicó el mismo corte bajo el rostrum o parte superior del pedúnculo ocular, finalizando con una incisión del primero al segundo corte. Obteniendo así no solo ojo y base peduncular, sino también la conexión entre ambos pedúnculos.

Hepatopáncreas: la extracción de este órgano se hizo tomando al animal por la parte ventral de tal forma que la parte dorsal queda expuesta. Para después cortar cada carapacho por su parte media desde el primer segmento abdominal hacia las anténulas flagelares, cortando al mismo tiempo las branquias. El carapacho fue levantado cuidadosamente dejando ver el hepatopáncreas para extirparlo.

Músculo (con cáscara): Se cortó lateralmente en el primer segmento abdominal para separar la cabeza del músculo (con cáscara).

V.2.3. Obtención de los homogenizados.

Los organismos fueron pesados en una balanza electrónica (OHAUS Corporation, modelo TS400 con resolución de 0.001/0.01g) y trasladados vivos en hielera de 10x20x10ms con agua marina artificial a el CIBIN, IMSS.

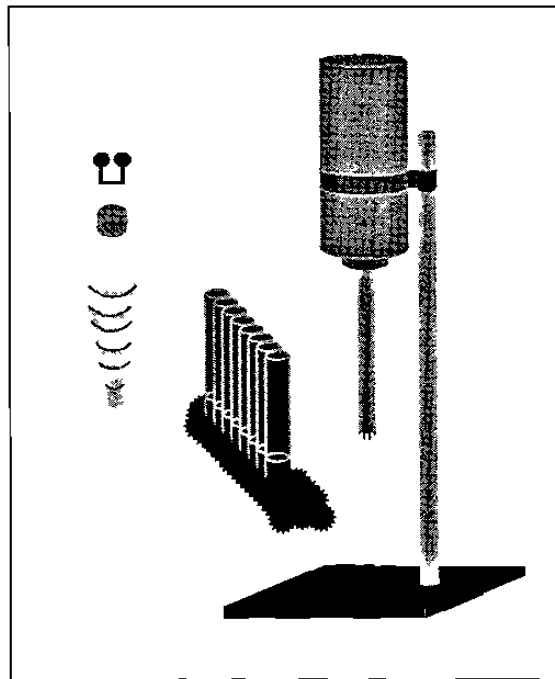


Esquema 5. Obtención de datos de los organismos.

En el preliminar¹ cada 0.5g de muestra se homogenizaba en 9 volúmenes de buffer de sucrosa 0.25M y EDTA 0.25mM, reportando los resultados de la **Se-GPx** en UE/mg prot.

Desde pesar cada muestra hasta obtener los extractos enzimáticos se requerían de 5-6h, el pesar las muestras es para mantener siempre una misma dilución, pero este dato no interviene numéricamente en ninguna operación matemática, por lo que se eliminó el pesar y homogenizar en 9 vol cada 0.5g de muestra.

A partir de lo cual, el obtener cada extracto enzimático tardaba 4h aproximadamente.



Esquema 6. Obtención de los homogenizados.

A los tubos Pyrex® de 25x200mm utilizados para homogenizar se les adicionaba buffer de sucrosa 0.25 M y EDTA 0.25 mM a un volumen adecuado, según la muestra, procurando fuese el mismo para cada tipo de muestra y se mantenían en hielo molido.

¹ Se hicieron varios preliminares con hígado de rata hembra de la raza Sprague dawley, donadas por el MVZ Gerardo, encargado el Bioterio del CIBIN, se anestesiaron las ratas con eter etílico, y la técnica de perfusión de hígado con cloruro de sodio al 0.9% para obtener el hígado libre de eritrocitos. Estos preliminares fueron infructuosos por varios errores (principalmente de temperatura y calibración de las micropipetas), y por ser más factible el conseguir camarón vivo (área de zootecnia de Maricultura), se continuaron los preliminares con estos.

Cada órgano disectado era introducido en los tubos de homogenización y mantenidos en hielo molido.

Se llevaron a cabo dos tipos de homogenizados:

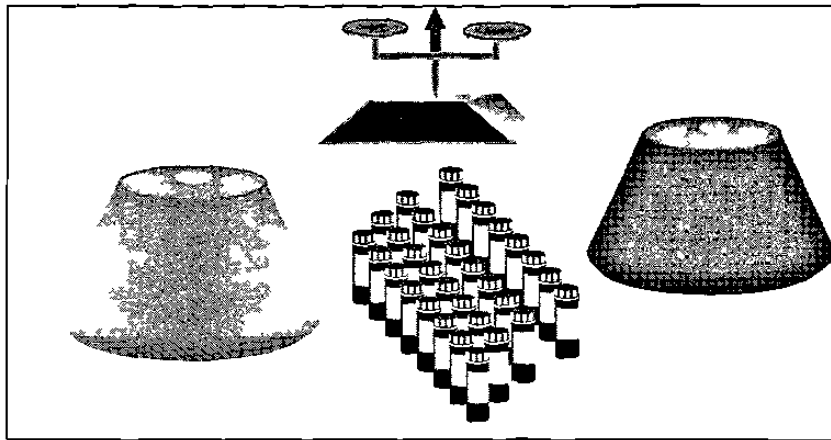
- colectivo e
- individual

Los homogenizados colectivos se utilizaron para determinar los efectos tiempo, temperatura y congelado, en estos se utilizaron cuatro muestras de cada órgano por tubo; mientras que en los individuales era órgano por tubo y estos se utilizaron en la determinación del efecto dieta.

Las homogenizaciones se llevaron a cabo en frío en un homogenizador de tejido (Bio-mixer™ Tempest Virtishear modelo 37600) con accesorio molidor macrofino (H3495-16), empezando en la velocidad 1 hasta la 6 por 40-60seg dependiendo del órgano y tipo de homogenizado.

V.2.4. Obtención de los extractos enzimáticos.

Cada homogenizado fue pasado a tubos de centrifugación de policarbonato con capacidad de 50ml, se igualaron pesos en una balanza mecánica (OHAUS Corporation, Harvard Trip® modelo 1450SO*RS) con el buffer de sucrosa 0.25M y EDTA 0.25mM. Se centrifugaron por 20min a 7,800xg a 4°C (DAMON/IEC DIVISION, modelo B-20A rotor 7/76).



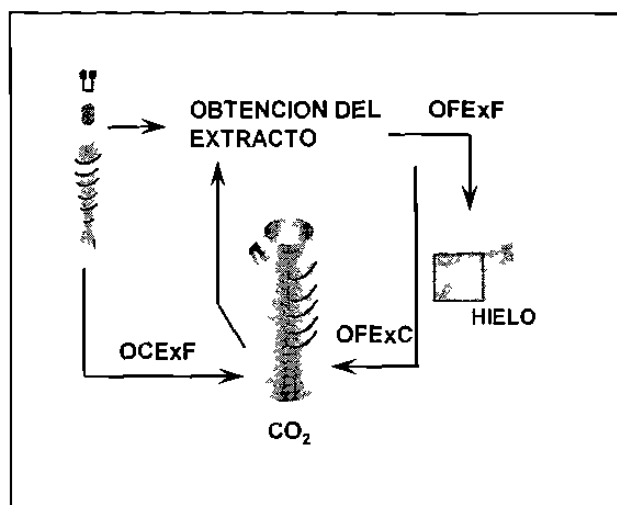
Esquema 7. Obtención de los extractos.

Se ultracentrifugó el extracto total a 17,000xg por 1h a 4°C (DAMON / IEC DIVISION, modelo B-60), teniendo cuidado al igualar pesos. Los extractos fueron traspasados a tubos de microcentrifugación de 1ml marca Eppendorf así como en viales de crio-conservación Nalgene® (Brand Products, Nalgene Company, a Subsidiary of Sybron Corp.; Rochester, N. Y. 14602-0365 USA) y mantenidos en hielo molido.

V.2.4.1. Conservación de los extractos.

En el estudio de los efectos tiempo y temperatura se utilizaron homogenizados colectivos y los extractos frescos; éstos se resguardaron en una pequeña hielera con hielo molido hasta llegar al laboratorio de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas, en donde se mantuvieron en refrigeración a 0°C.

Para el efecto congelación, al disectar los órganos la mitad lateral de estos se mantuvo en hielo carbónico a -54°C, denominando así a los extractos como de órgano fresco extracto fresco (OFExF) y de órgano congelado extracto fresco (OCExF); al momento de obtener los OFExF, se guardó la mitad de los extractos a -54°C llamándoseles órgano fresco extracto congelado (OFExC) como se muestra en el esquema 8. Para la determinación de proteína se almacenaron los extractos a -70°C en un ultracongelador (Fridge Ultralow Revco Scientific, Inc.) modelo ULT1386-3-A14.



Esquema 8. Congelación.

V.2.5. Cinéticas enzimáticas

Se determinó la actividad de la enzima glutatión reductasa por el método de Massey & Williams (1965), ya que esta es necesaria en la determinación de la enzima glutatión peroxidasa.

Se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS (Beckman Instruments, Inc. modelo DU-650). No fue necesario hacer la reacción de blanco, ya que la reacción no enzimática de GSSG y NADPH es cero. La enzima fue almacenada pura a 2°C (refrigerador casero marca Kelvinator) para ser utilizada en diluciones de 10UE/ml

Para la determinación de **Se-GPx** se corrió el método de Paglia & Valentine (1967) modificado por Lawrence *et al.* (1974). En el cual se usa H₂O₂ como sustrato manteniendo constante la concentración de glutatión reducido (GSH) mediante el suministro exógeno de la enzima glutatión reductasa (GSH-Rx) y del NADPH, los cuales convierten el glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH). Se mide la velocidad de formación de GSSG siguiendo la disminución de la absorbancia de la mezcla a 340nm como NADPH transformado a NADP.

Se llevaron a cabo lecturas de blancos cada 4-5 cinéticas, teniendo especial cuidado en que éstas empezaran con una absorbancia de 0.6-0.7 y que las pendientes fueran de 0.010-0.018. De no ser así, el NADPH o la GSH-Rx se hacían nuevamente

Las incubaciones se hicieron en baño maría a 25°C por 5min con movimiento de 20-30ciclos/min (Reciprocal Water Bath Shaker, Shark-R-Bath™ modelo 3582; Lab-line® Instruments Inc. Melrose Park Il 60160-1491 U.S.A.). Las cinéticas se realizaron en una cubeta de cuarzo, con capacidad de 1ml, de 1cm de longitud y 3mm de ancho, por 3min a 25°C con un controlador de temperatura (Beckman Instruments, Inc.) y un pH7. Los datos fueron registrados en impresora matricial (Action Printer 4,000).

Cada Unidad Enzimática es definida como 1μmol de GSH oxidado por minuto usando un coeficiente de extinción molar de 6.22×10^6 para NADPH y una estequiometría de reacción de 2 moles de GSH formado por mol de NADPH oxidado. Las unidades enzimáticas se reportan referidas a miligramos de proteína (UE/mg prot)

V.2.6. Determinación de proteína.

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Lowry (1951) modificado (anexo 5) cuyo rango de determinación es de 1-1,500μg/ml.

Está basado en la reducción de Cu^{++} a Cu^+ a 750nm en la presencia de proteína. En donde el reactivo de biuret quela el ion Cu^+ a una forma compleja. El reactivo de Folin & Ciocalteu es para mejorar la formación del color azul

Las reacciones se llevaron en viales Kimble (Div. of 0-1 modelo 60915-D) de 1dram; se utilizó un Vortex Mixer (Maxi Mix II type 37600 Barnstead/Thermolyne) para tener un mezclado vigoroso.

V.2.7. Análisis estadísticos.

Los datos registrados (en impresora matricial Action Printer 4,000) de las pendientes de los blancos y de los extractos en la determinación de **Se-GPx** y sus valores de proteína soluble total fueron capturados en hoja de cálculo (Microsoft Excel® for Windows versión 5.0) para ser utilizados bajo las siguientes ecuaciones:

Para las UE/ml

$$UE/ml = (\text{factor de dilución}) * (\text{factor de concentración}) * (A_{340nm}) * 2$$

Reportando como UE/ml = μ moles de GSHox/min/ml

Para las UE/mg prot

$$UE/mg\ prot = \frac{(UE/ml)}{(mg\ prot/ml)}$$

VI. RESULTADOS.

El método de Paglia & Valentine (1964), modificado por Lawrence *et al.* (1974) refiere llevar a cabo las cinéticas enzimáticas a 25°C, pero no menciona un rango de confianza dentro del cual se puedan realizar éstas lecturas; aún contando con un controlador de temperatura en el espectrofotómetro ésta alcanzó a ser cercana a 28°C.

Por lo que se llevaron a cabo cinéticas de los extractos de órganos a diferentes temperaturas, pero la incubación previa siempre fue a 25°C.

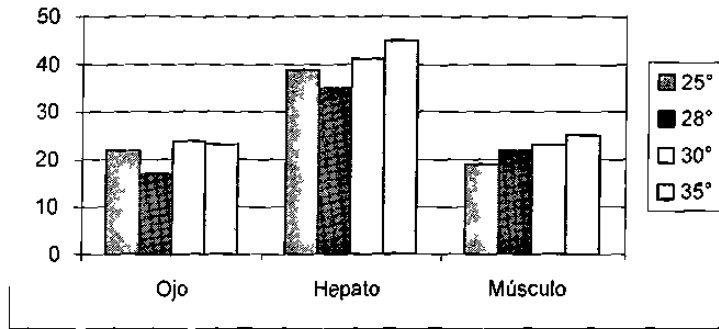
VI.1. Efecto temperatura.

En la gráfica 1 se observa el comportamiento de cada extracto para las diferentes temperaturas en que se corrieron las cinéticas enzimáticas, los valores más altos se encuentran para el hepatopáncreas, siendo muy parecidos los extractos de ojo y músculo (con cáscara).

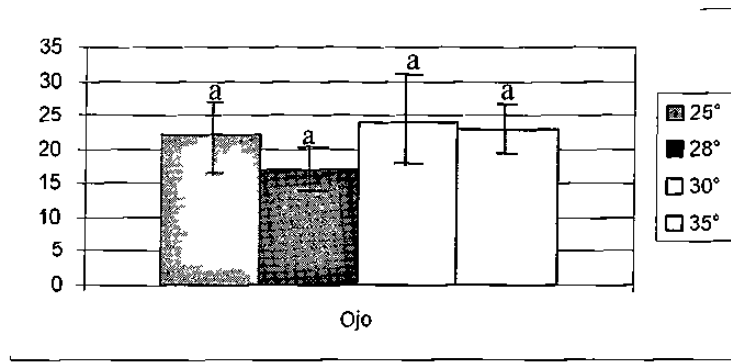
Se realizó un análisis bifactorial de 2 vías, reportado en la tabla 7, que nos demuestra que hay diferencias altamente significativas entre los extractos y entre temperaturas, así como en su interacción.

Tabla 7. Factorial efecto temperatura.

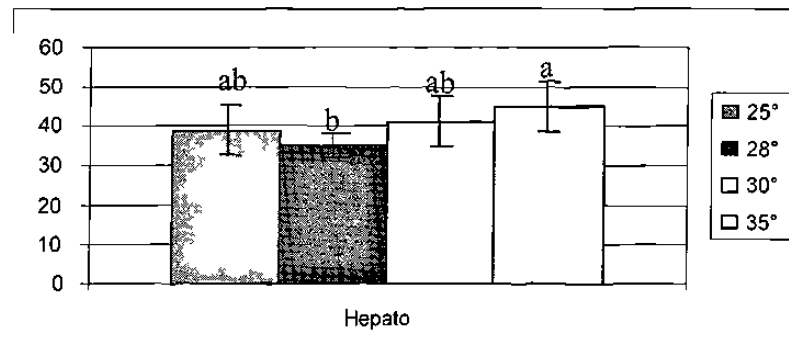
	Probabilidad
Entre efectos	0.000
Extractos	0.000
Temperatura	0.005
Interacción Ext-T°C	0.024



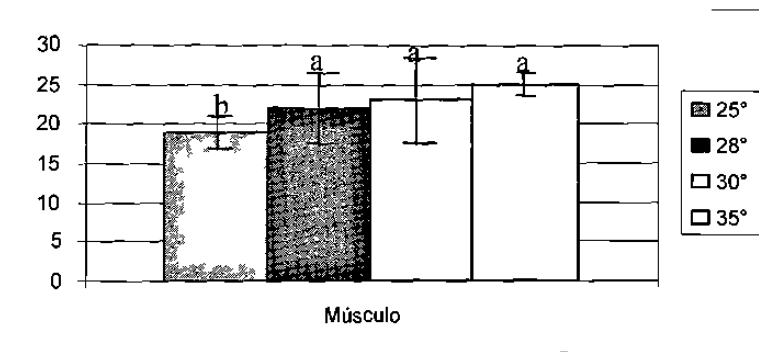
Gráfica 1. Efecto de la temperatura sobre los extractos



Gráfica 2. Efecto de la temperatura sobre el extracto ojo



Gráfica 3. Efecto de la temperatura sobre el extracto hepatopáncreas



Gráfica 4. Efecto de la temperatura sobre el extracto músculo

Analizando por separado cada extracto, como se muestra en la tabla 8, tenemos que en el extracto ojo no hay diferencia significativa para llevar a cabo las lecturas a cualquier temperatura (gráfica 2), a 30°C se tiene una desviación estándar más amplia que para el resto de las temperaturas.

Tabla 8. Efecto de la temperatura por extracto.

Extracto \ T°C	25°C	28°C	30°C	35°C	ANOVA
Ojo	21.96 ± 5.6 (24) a	16.07 ± 4.1 (9) a	22.34 ± 8.3 (9) a	21.65 ± 4.4 (3) a	0.0792
Hepatopáncreas	38.01 ± 7.0 (21) ab	34.52 ± 3.0 (9) b	41.29 ± 6.6 (9) ab	44.70 ± 6.5 (3) a	0.0528
Músculo (con cáscara)	17.87 ± 2.4 (21) b	22.48 ± 4.4 (9) a	22.72 ± 5.9 (6) a	25.02 ± 1.0 (3) a	0.0009

Los resultados están dados en UE/mg proteína.

Los valores entre paréntesis () son el número de replicados.

Las letras en negritas definen los subgrupos homogéneos (P = 0.05).

En el extracto hepatopáncreas (gráfica 3), las desviaciones estándares son muy parecidas para cada caso, excepto a 28°C en donde la desviación estándar se reduce a la mitad; en este caso en particular se observa que leer a 25°C ó 30°C da los mismos resultados estadísticos, a 28°C se observa una ligera disminución en las lecturas.

Mientras que para el músculo (con cáscara) leer a 25°C es diferente a hacerlo a cualquier otra temperatura, y al leer en las demás temperaturas es igual estadísticamente, como se puede ver en la gráfica 4.

VI.2. Efecto tiempo.

Se llevaron a cabo cinéticas enzimáticas a tiempos diferentes de obtenerse los extractos. En su análisis factorial hay diferencia significativa con respecto a los extractos, pero no con el tiempo; la interacción entre ambos también es significativa (tabla 9). En la gráfica 5 se encuentra el comportamiento de éstos; los datos más altos son en extracto hepatopáncreas, después en ojo y finalmente en músculo (con cáscara).

Tabla 9. Factorial efecto tiempo.

	Probabilidad
Entre efectos	0.000
Extractos	0.000
Tiempo	0.542
Interacción Ext-Tiem	0.003

En la tabla 10 se encuentran los resultados por extracto.

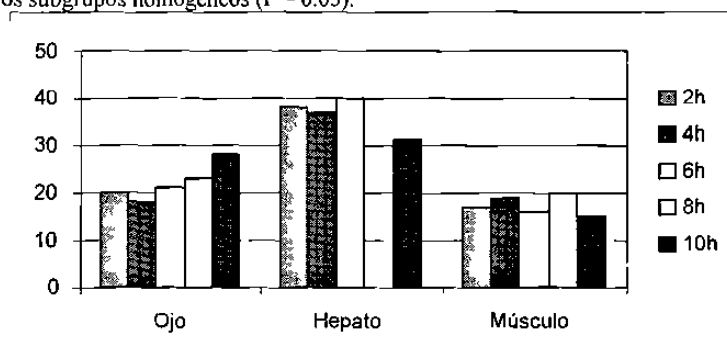
Tabla 10. Efecto del tiempo entre la obtención de los extractos y su cinética.

Extracto \ Tiempo	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	Anova
Ojo	19.83 ± 2.6 (6) b	17.73 ± 3.9 (6) b	20.37 ± 0.0 (3) b	22.92 ± 0.0 (3) ab	28.65 ± 6.2 (6) a	0.0020
Hepatopáncreas	38.46 ± 3.1 (6) a	37.49 ± 0.0 (3) a	40.11 ± 9.7 (9) a		31.29 ± 1.5 (3) a	0.3286
Músculo (con cáscara)	18.53 ± 2.4 (6) ab	19.62 ± 0.0 (3) ab	16.54 ± 2.2 (6) bc	20.13 ± 1.9 (3) a	15.23 ± 1.0 (3) c	0.0268

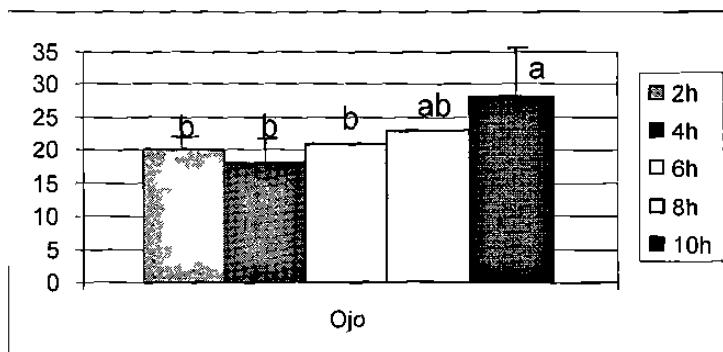
Los resultados están dados en UE/mg proteína.

Los valores entre paréntesis () son el número de replicados.

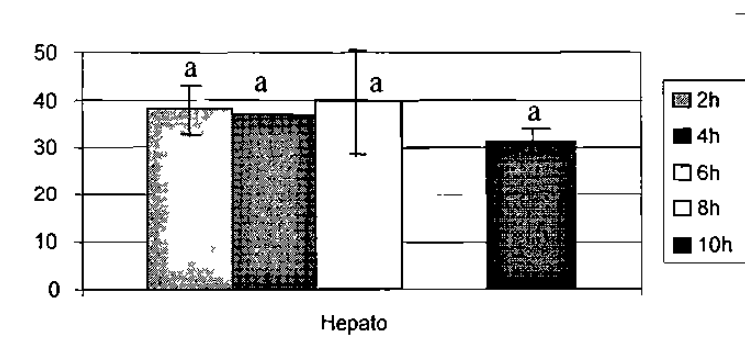
Las letras en negritas definen los subgrupos homogéneos ($P = 0.05$).



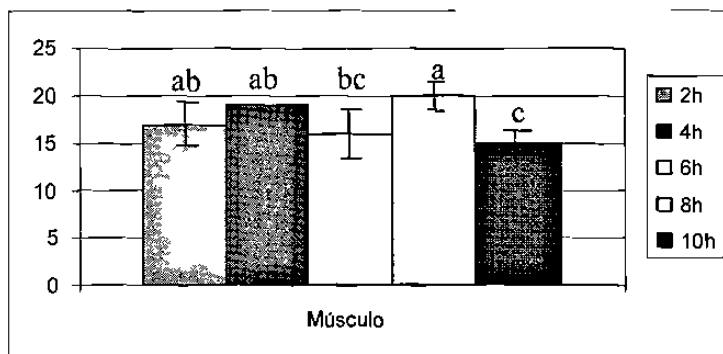
Gráfica 5. Efecto tiempo sobre los extractos



Gráfica 6. Efecto tiempo sobre el extracto ojo.



Gráfica 7. Efecto tiempo sobre el extracto hepatopáncreas.



Gráfica 8. Efecto tiempo sobre el extracto músculo.

El extracto ojo a las 2, 4 y 6 horas conserva la misma actividad enzimática, la cual va aumentando conforme sigue pasando el tiempo (gráfica no.6).

En el extracto hepatopáncreas (gráfica no. 7) se mantiene la actividad hasta las 10 horas después de obtener el extracto, no se realizaron lecturas a las 8 horas, se tiene una desviación estándar muy grande a las 6 horas.

Pero en el extracto músculo (con cáscara) las desviaciones son muy pequeñas, como se observa en la figura no. 8. A las 2 y 4 horas se conserva su actividad, la cual va decayendo conforme pasa el tiempo.

VI.3. Efecto congelación.

Al analizar el efecto congelación en los diferentes extractos, se tiene un efecto similar de las formas de congelado, como se indica en la tabla 11.

Tabla 11. Factorial efecto de la congelación.

	Probabilidad
Entre efectos	0.000
Extractos	0.000
Congelación	0.001
Interacción Ext-Cong	0.349

En la gráfica no. 9 se observa que los diferentes extractos tienden a aumentar su actividad al congelarlos (OFExF vs OFExC); la actividad se ve un poco afectada cuando la congelación se realizó a nivel de órganos (OFExF vs OCExF); excepto para el ojo. En la tabla 12 se tienen las variaciones para cada extracto así como su probabilidad.

Tabla 12. Efecto de la congelación en los extractos.

Congelación \ Extracto	OFExF	OFExC	OCExF	ANOVA
Ojo	6.00 ± 2.0 (3) b	13.50 ± 0.9 (3) a	10.40 ± 2.1 (3) a	0.0060
Hepatopáncreas	15.50 ± 0.5 (3) a	20.62 ± 5.5 (3) a	15.22 ± 3.1 (3) a	0.2073
Músculo (con cáscara)	9.87 ± 0.6 (3) b	13.09 ± 0.6 (3) a	9.41 ± 1.6 (3) b	0.0088

Los resultados están dados en UE/mg proteína.

Los valores entre paréntesis () son el número de replicados.

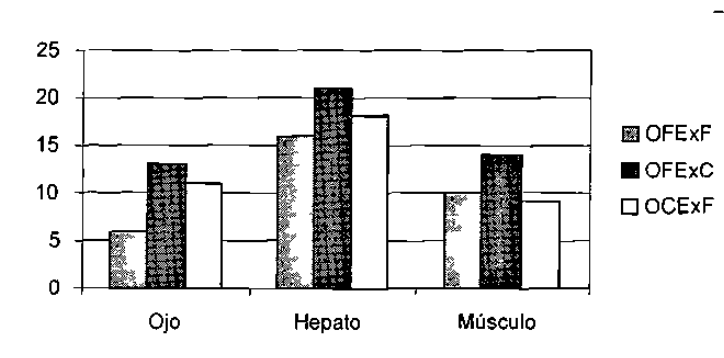
Las letras en negritas definen los subgrupos homogéneos (P = 0.05).

OFExF : órgano fresco extracto fresco OFExC : órgano fresco extracto congelado OCExF : órgano congelado extracto fresco

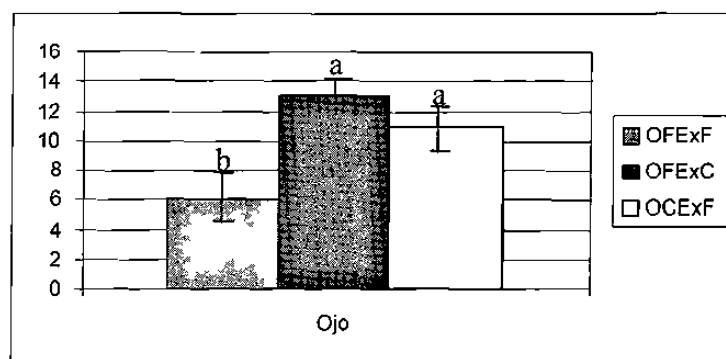
Al congelar el extracto ojo y después hacer la cinética la actividad se ve duplicada, mientras que al congelar el tejido aumenta sólo en un 50%. La desviación estándar es menor al congelar el extracto, lo que no sucede con el extracto congelado ó cuando se congela el tejido primero como se observa el la gráfica 10.

En hepatopáncreas las lecturas aumentan al congelar el extracto, sin embargo no hay diferencia significativa al congelar el órgano (OFExF vs OFExC vs OCExF), probablemente debido a que la desviación estándar del extracto congelado es demasiado amplia (gráfica 11).

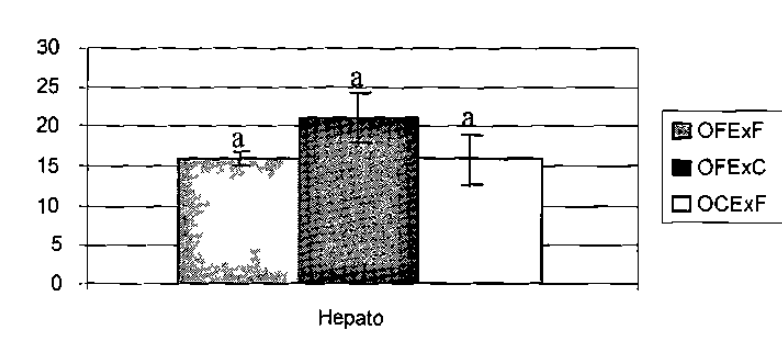
En la gráfica 12 se tiene la actividad del músculo (con cáscara), siendo estadísticamente comparables el congelar el tejido y el no congelarlo, pero la congelación del extracto sí aumenta la actividad de manera significativa.



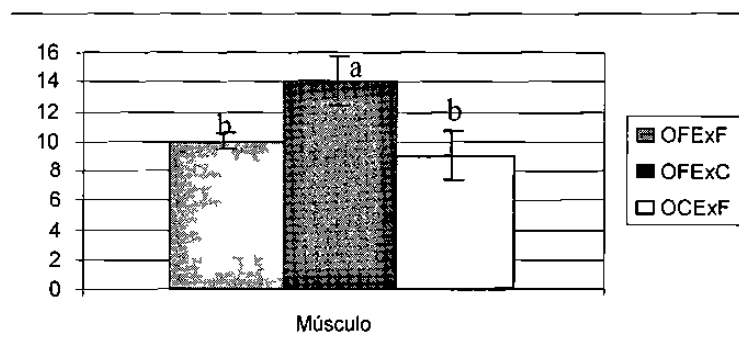
Gráfica 9. Efecto congelación sobre los extractos.



Gráfica 10. Efecto congelación sobre el extracto ojo.



Gráfica 11. Efecto congelación sobre el extracto hepatopáncreas.



Gráfica 12. Efecto congelación sobre el extracto músculo.

VI.4. Efecto dieta.

VI.4.1. Efecto dieta, con eliminación de valores extremos.

Los resultados tuvieron desviaciones muy amplias y en algunos casos fue necesario eliminar lecturas extremas, lo cual refiere un buen control sobre el método (repetibilidad), pero una gran variabilidad entre organismos.

Llevando a cabo un análisis factorial, nos indica que hay diferencias altamente significativas por extractos y por dietas, así como la interacción entre estos factores como se demuestra en la tabla 13.

Tabla 13. Factorial efecto de las dietas

	Probabilidad
Entre efectos	0.000

	Probabilidad
Extractos	0.000
Dietas	0.001
Interacción Ext-Dieta	0.000

En la tabla no. 14 (y gráfica 13) se observan los promedios por extracto para cada dieta, dándose la actividad mayor en extracto hepatopáncreas, ojo y finalmente músculo (con cáscara) (excepto en la dieta base para el extracto ojo).

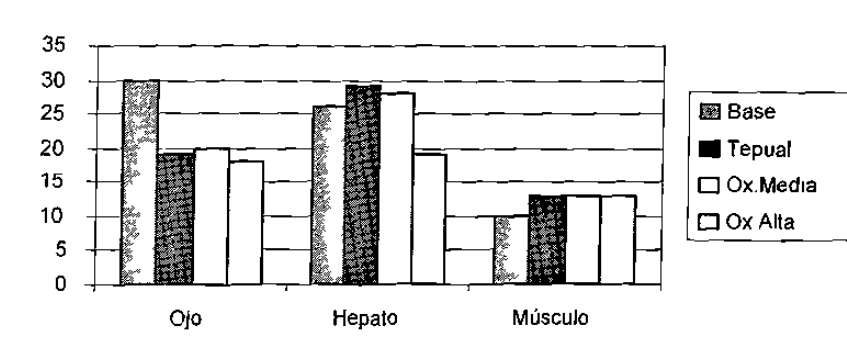
Tabla 14. Efecto de las dietas por extracto, eliminando valores extremos.

Dietas \ Extracto	Base	Tepual	Media	Alta	ANOVA
Ojo	30.27 ± 13.0 (7) a	18.39 ± 4.1 (6) b	19.96 ± 7.0 (16) b	17.55 ± 7.1 (10) b	0.0155
Hepatopáncreas	25.6 ± 3.8 (8) a	28.49 ± 8.2 (11) a	28.12 ± 6.0 (16) a	18.83 ± 4.6 (17) b	0.0001
Músculo (con cáscara)	9.86 ± 1.0 (6) b	13.39 ± 3.2 (10) a	13.27 ± 2.8 (18) a	13.46 ± 3.3 (15) a	0.0733

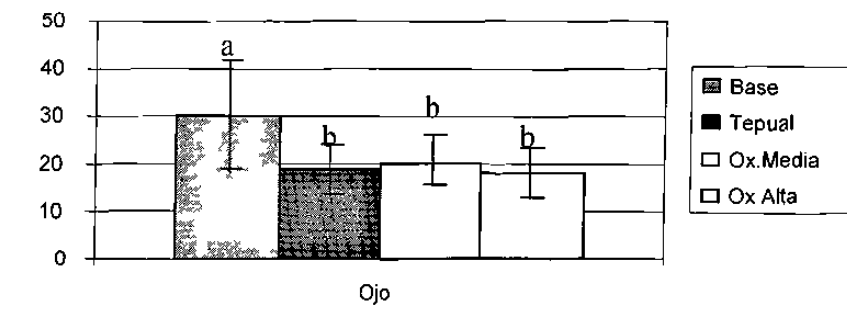
Los resultados están dados en UE mg proteína.

Los valores entre paréntesis () son el número de replicados.

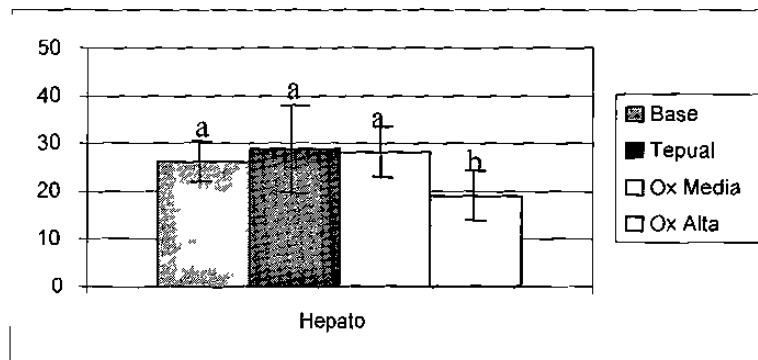
Las letras en negritas definen los subgrupos homogéneos (P = 0.05).



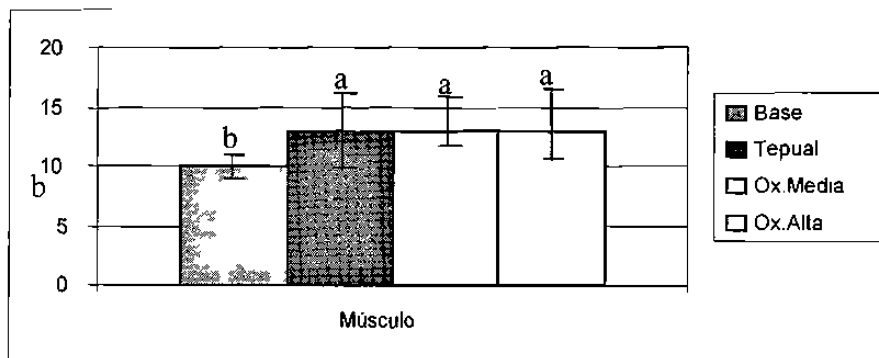
Gráfica 13. Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre los extractos



Gráfica 14. Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre el extracto ojo.



Gráfica 15. Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre el extracto hepatopáncreas.



Gráfica 16. Efecto dieta, con eliminación de valores extremos, sobre el extracto músculo.

En el extracto ojo no hay diferencia significativa entre las dietas experimentales incluyendo el control interno, pero si la hay con la dieta base, en la cual se tiene una mayor actividad y también una mayor desviación estándar (gráfica 14).

En el hepatopáncreas no hay diferencia significativa entre las dietas base, tepual y de mediana oxidación, pero si la hay en la dieta con alta oxidación como se aprecia en la gráfica 15.

En el extracto músculo (con cáscara) se repite el caso del extracto ojo, no hay diferencia significativa entre las dietas experimentales y su control interno, pero sí la hay con la dieta base, aunque en forma contraria, las actividades más altas se tienen en las dietas experimentales (gráfica 16).

VI.4.2. Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos.

En la tabla 15 se encuentran los resultados del ANOVA para cada dieta por extracto, tomando en consideración aquellos valores extremos, los cuales fueron repetibles por extracto pero no así por organismo (gráfica 17).

Tabla 15. Efecto de las dietas por extracto, sin eliminar valores extremos.

Dietas \ Extracto	Base	Tepual	Media	Alta	Anova
Ojo	25.13 ± 15.2 (9) a	13.85 ± 7.8 (9) a	17.06 ± 9.7 (18) a	20.15 ± 17.4 (18) a	0.3122
Hepatopáncreas	24.65 ± 4.6 (9) a	26.97 ± 9.5 (12) a	26.50 ± 10.3 (21) a	17.97 ± 5.3 (18) b	0.0074
Músculo (con cáscara)	9.02 ± 1.5 (9) b	11.91 ± 3.8 (12) a	11.43 ± 3.2 (21) ab	11.14 ± 3.9 (17) ab	0.2528

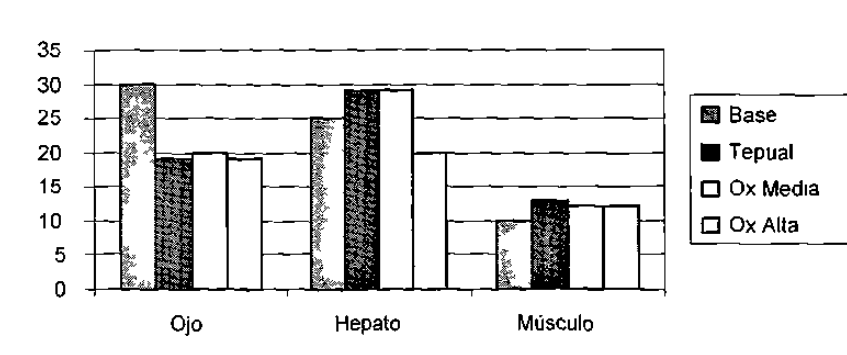
Los resultados están dados en UE mg proteína.

Los valores entre paréntesis () son el número de replicados.

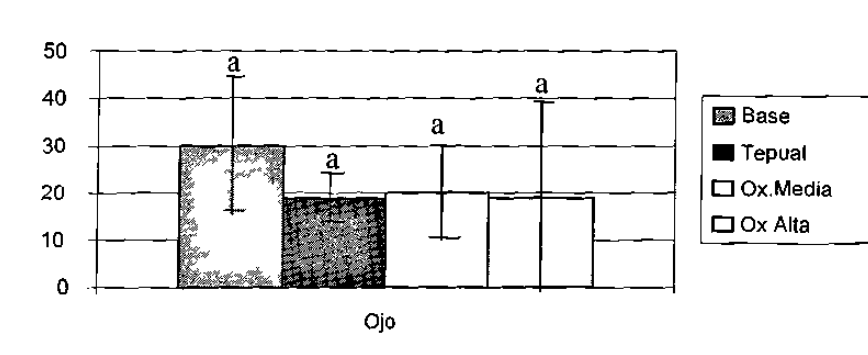
Las letras en negritas definen subgrupos homogéneos (P = 0.05).

En el extracto ojo se observan, para las dietas base y altamente oxidada desviaciones estándares muy amplias, por lo que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (gráfica 18).

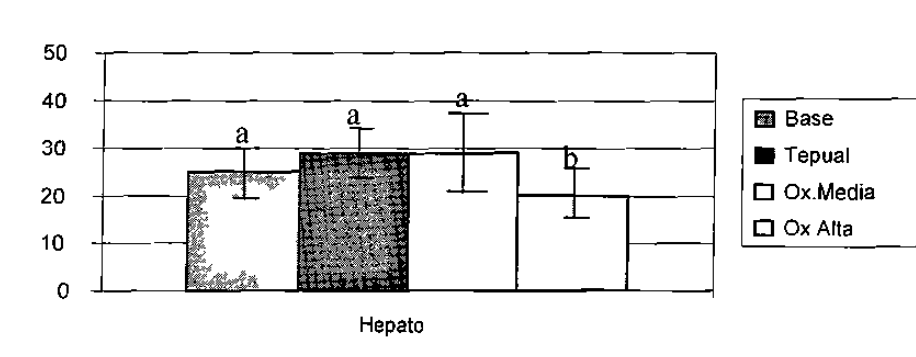
En el extracto hepatopáncreas (gráfica 19) las desviaciones más grandes son para las dietas tepual y medianamente oxidada, el comportamiento estadístico es igual al análisis sin los datos extremos; sucediendo lo mismo en el análisis para el extracto músculo (con cáscara) por dieta (gráfica 20).



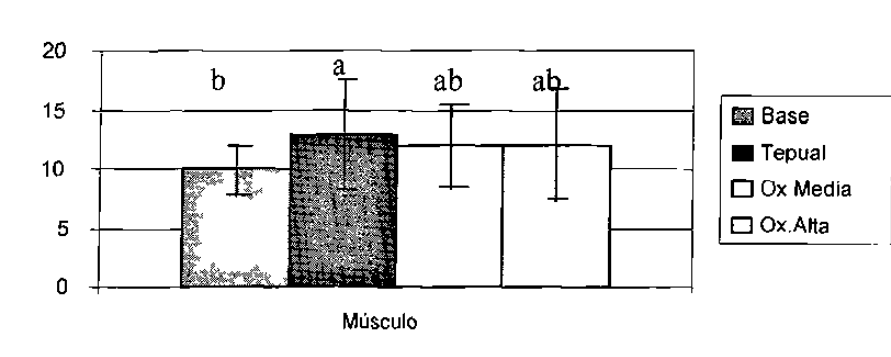
Gráfica 17. Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre los extractos.



Gráfica 18. Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre el extracto ojo.



Gráfica 19. Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre el extracto hepatopáncreas.



Gráfica 20. Efecto dieta, sin eliminación de valores extremos, sobre el extracto músculo.

VI.4.3. Proteína

En cuanto a la cantidad de proteína soluble en los extractos por dieta, ésta se observa en la gráfica 21; en donde la mayor cantidad de proteína soluble se encuentra en extracto músculo (con cáscara), hepatopáncreas y finalmente en ojo.

En el extracto ojo no se encuentran diferencias significativas de proteína soluble, pero en hepatopáncreas las dietas base y tepual dieron la misma respuesta estadística, siendo la dieta altamente oxidada quien proporcionó una mayor cantidad de proteína soluble al extracto. En el extracto músculo (con cáscara) las que proporcionaron más proteína soluble fueron las dieta base y tepual, mientras que las otras dietas dieron la menor cantidad de proteína soluble (tabla 16).

Extracto / Dietas

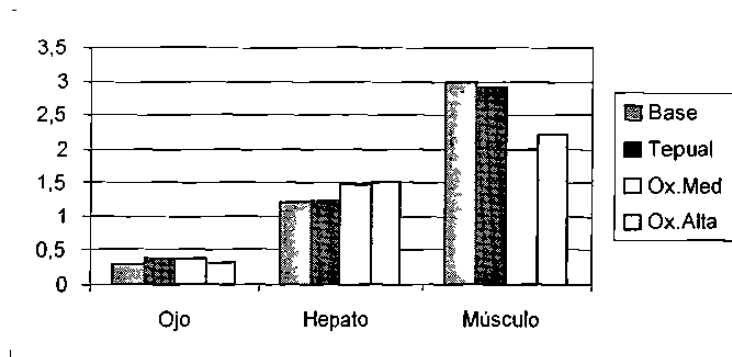
Tabla 16. Efecto de las dietas en la cantidad de proteína soluble por extracto.

Dietas / Extracto	Base	Tepual	Media	Alta	Anova
Ojo	0.31 ± 0.10 (9) a	0.39 ± 0.05 (9) a	0.38 ± 0.07 (18) a	0.33 ± 0.14 (18) a	0.2326
Hepatopáncreas	1.13 ± 0.17 (9) b	1.16 ± 0.31 (12) b	1.37 ± 0.51 (21) ab	1.52 ± 0.46 (18) a	0.0704
Músculo (con cáscara)	3.03 ± 0.36 (9) a	2.95 ± 0.82 (12) a	2.02 ± 0.66 (21) b	2.21 ± 0.65 (17) b	0.0001

Los resultados están dados en mg proteína.

Los valores entre paréntesis () son el número de replicados.

Las letras en negritas definen subgrupos homogéneos (P = 0.05).



Gráfica 21. Efecto dieta sobre la proteína de los extractos.

VII. DISCUSIÓN.

La técnica de Paglia & Valentine (1964), modificada por Lawrence *et al.* (1974) para la determinación de GPx-Se, demostró ser adecuada para la determinación de la misma enzima en camarón, tal y como fue utilizada por Sunde (Sunde *et al.* 1980 y Sunde, 1990) en hígado de ratas y por Meléndez (1994) en plasma humano.

VII.1. Efecto temperatura

La temperatura tiene un efecto importante durante el desarrollo de la lectura de la actividad enzimática, como lo menciona Hiram (1992). Por lo que es importante cuidar los rangos de temperatura en que se hacen las cinéticas.

VII.2. Efecto tiempo y efecto congelación.

Nakano *et al.* en 1992 detectaron actividad de GPx en músculo y piel de peces. Cuando los filetes de salmón fueron almacenados a -50°C, la actividad de la GPx se incrementó gradualmente durante su almacenamiento. La GPx en músculo de pescado es potencial para la prevención del deterioro oxidativo en músculo durante su almacenaje y procesado.

Este mismo efecto del tiempo se presentó en el trabajo actual entre la obtención de los extractos y la realización de sus cinéticas enzimáticas, cuando se conservaron los extractos congelados. Pero no así al analizar extractos frescos de órganos frescos ó extractos frescos de órganos congelados, ya que la actividad de los OFExF se mantuvo muy parecida a la de los OCExF, aumentando la actividad cuando se trataba de los OFExC.

VII.3. Efecto Dieta.

Las dietas utilizadas en el presente estudio fueron las mismas que utilizó Montaña (1998) al estudiar el efecto de la oxidación de lípidos en harina de subproductos de atún sobre el crecimiento del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bone) en condiciones de laboratorio, encontrando que la mejor tasa de crecimiento promedio a los 28 días se obtuvo para la dieta Tepual (chilena), después sin diferencia significativa la fresca y la de mediana oxidación, seguida por la de alta oxidación y por último la dieta base. La mejor tasa de conversión alimenticia promedio a los 28 días se dio en la Tepual y sin diferencia significativa para las tres dietas de subproducto de atún, por último la dieta base.

En la evaluación de la fluctuación de la actividad de la enzima **Se-GPx** en camarón blanco alimentado con dietas conteniendo harinas con diferentes grados de oxidación, se obtuvieron valores extremos en algunos casos por lo que se hicieron dos análisis estadísticos para el efecto dieta. En el caso del extracto ojo con eliminación de valores extremos se presenta una mayor actividad cuando fueron alimentados con la dieta base, y no hay diferencia entre los alimentados con dieta Tepual (sin oxidación) y los que fueron alimentados con dietas oxidadas, mientras que sin eliminar los valores extremos no hay diferencia significativa en ninguna dieta. En ambos casos, en el extracto ojo se tiene un comportamiento igual o muy parecido dando como resultado una menor actividad enzimática de **Se-GPx** cuando fueron alimentados con una dieta con alto grado de oxidación.

En el extracto hepatopáncreas, en ambos casos los resultados son similares, sin diferencia significativa para las dietas Base, Tepual y oxidación media, pero con diferencia para la dieta de oxidación alta, en donde se tiene la menor actividad enzimática.

Para el extracto músculo (con cáscara) se obtuvo un comportamiento inverso, sin diferencia significativa para las dietas Tepual, oxidación media y oxidación alta y la menor actividad enzimática para la dieta Base.

VIII. CONCLUSIONES.

Existe actividad de la enzima glutatión peroxidasa selenio dependiente (**Se-GPx**) en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bonne). La mayor actividad de la **Se-GPx** se encuentra en el hepatopáncreas, seguida por la actividad en ojo y finalmente en músculo.

El control de la temperatura es un factor muy importante que se debe mantener monitoreado a 25°C.

En los extractos de los tejidos obtenidos de hepatopáncreas, ojo y músculo (con cáscara) conservados a 0°C, la actividad de la enzima **Se-GPx** disminuye significativamente si se almacenan estos extractos por más de 10 horas antes de ser analizados.

Para no tener variaciones en las cinéticas de **Se-GPx** entre muestras procesadas en diferentes tiempos, se debe trabajar con órganos frescos y extractos frescos (OFExF) preferentemente, sin embargo, si, por cuestiones de tiempo en los laboratorios, es necesario realizar cinéticas enzimáticas en diferentes momentos, no se tendrán diferencias en las cinéticas si se congelan las muestras como órganos (OCExF) y después se obtienen los extractos. En contraste, la conservación de extractos en congelación lleva a un aumento artificial de la actividad de **Se-GPx**.

Cuando al camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bonne) se le suministra altos grados de rancidez en el alimentado, la actividad de la enzima **Se-GPx** es estimulada en músculo, no así en ojo ni en hepatopáncreas.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Akiyama, D.M., W.G., Dominy. and A.L., Lawrence. 1991. Penaeid Shrimp Nutrition for the Commercial Feed Industry: Revised. In: Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. American Soybean Association. Singapore. pp 80-98.
- Anderson. S.J., S.P. Lall, D.M. Anderson, and M.A. McNiven. 1993. Evaluation of Protein Quality in Fish Meals by Chemical and Biological Assays. *Aquaculture*, 115: 305-325.
- Badui, D.S.. 1993. Química de los alimentos. 3ª edición, Edit. Alhambra, Mexicana. 639 pp.
- Boryslawskyj, M. , Garrod , Pearson and Woodhead, D. 1988. Elevation of glutathione S-transferase activity as a stress to organochloride compounds, in the freshwater mussel, *Sphaerium corneum*. *Mar. Env. Res.* vol24 No. 1-4.
- Chamberlain, G. W. 1995 Frontiers in shrimp nutrition research. *Aquaculture Abs.* 1995:82
- Cruz Suárez, L. E., R. Robledo-De León, D. Ricque. 1992. Evaluation of Tuna Byproducts Meal as a Protein Source for *Penaeus vannamei* Shrimp Feed in a Controlled Environment. Abstract of Aquaculture American '92. National Shellfisheries Association, Fish Culture Section on the American Fisheries Society and World Aquaculture Society. Orlando florida, U.S.A.:pp.73
- Gadient, M.,P. Hofmann and B. Cafantaris. 1995. Comparative efficacy of vitamin C derivatives in shrimp: Stability when added to feed and water. *Aquaculture Abs*, 1995:76
- Gallagher, E.P., B.M. Hasspieler, and R.T. Di-Guilio. 1992. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. *Biochem Pharmac.* vol 43 No 10:2209-2215.
- George. S. Buchaman, G. Nimmo Y. and Hayes J. 1989. Fish and mammalian liver cytosolic glutathione S-transferase: substrate specificities and immunological comparison. *Mar. Envirom. Res* Vol 28 No 1-4.
- Goldfarb, P. Spry, J.A. Dunn, D. Livingstone, D. Wiseman, A. Gibson, G.G. 1990. Detection of mRNA sequences homologous to the human glutathione peroxidase and rat cytochrome P-450IVA1 genes in *Mytilus edulis*. *Mar environ. Res* vol 28 no1-4.
- Hiram, G.F. 1992. Basic concepts in biochemistry. McGraw Hill, Inc. Health Professions Division. Chapter 6-7.
- Johnson, F. C. 1971. A critical review of the safety of phenolic antioxidants in foods. *Critical reviews in Food Technology* 1971: 267-304
- Johnson, M. A. and J. G. Fischer. 1994. Role of minerals in protection against free radicals. *Food Technology* 48(5):112-120.
- Kanazawa, Akio. 1984. Nutrition of Penaeid Prawns and Shrimps. First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Hoilo City, Philippines. pp 123-130.

- Labuza, P.T.. 1971. Kinetics of Lipid Oxidation in Foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*. Vol.2, 3:pp 355-405.
- Lee, R.F. 1988. Glutathione S-transferase in marine invertebrates from Langesundfjord. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol 46 No1-3
- Lee, G.P. and A.L. Lawrence. 1997. Digestibility: Crustacean Nutrition. *Advances in World Aquaculture* Vol. 6. Edited by Louis R.D. Abramo; Douglas E. Conklin and Dean M. Akiyama. World Aquaculture Society. Louisiana, U.S.A. pp. 194-260.
- Lehninger, A. L. 1982. *Bioquímica*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona 5A. reimpresión 98-99, 805-807, 726-727.
- Livingstone, D.R, Lips, F., García-Martínez, P. and R. K. Pipe. 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol* vol 112 No.2: 265-276.
- McCord, J. M. 1994. Free radicals and prooxidants in health and nutrition. *Food technology* 48(5) 106-111
- Meléndez Torres, J.M. 1994 Determinación de selenio en los alimentos regionales y el estado nutricional de selenio en adultos voluntarios de la Ciudad de Hermosillo Sonora. M.C. Tesis. CIAD. Hermosillo Son., México.
- Meyers, P.S. 1990. Basics of Aquaculture and aquaculture feeds. Food Science Department. Louisiana State Univ. Chapter 90:1-27
- Montaño Aguilar, D.M. 1998. Efecto de la oxidación de lípidos en harina de subproductos de atún sobre el crecimiento del camarón blanco (*Penaeus vannamei* Bone) en condiciones de laboratorio. M.C. Tesis UANL, FCB Monterrey Nuevo León, México.
- Nakano, T. M. Sato and M. Takeuchi 1992. Glutathione peroxidase of fish. *J. of food science* vol 57(5):1116-1119
- Nakano, T. Sato, M. Takkeuchi, M. 1992. Glutathione peroxidase of fish. *J Food Sci.* vol 57 no. 5 1116.1119
- Opstvedt, J.. 1985. Correlation Between Different Measurements of Lipid Oxidation in Feed Ingredients and Compound Feed. In: 8th. European Symposium on Poultry Nutrition. The World's Poultry Science Association. Israel Branch. pp. 193-197.
- Opstvedt, J.. 1985b. Lípidos de Pescado en Nutrición Animal. Norwegian Herring Oil & Meal Industry Research Institute. En: Memorias del Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. Vol. 1 Harina y Aceite de Pescado en Nutrición Animal. Nuevo León, México 1992.
- Paglia, D. And Valentine, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70:158.

- Patel, B. , Chandy, J.P. and Patel, S. 1990. Effect of mercury, selenium and glutathione on sulphhydryl levels and glutathione reductase in blood clam *Anadara granosa*. Indian. J. Mar. Sci. vol 19 No3:187-190.
- Piggot, M. G. and Tucker, W.B.. 1990. Seafood, Effects of Technology on Nutrition. Marcel Dekker. New York, U.S.A. 362 pp.
- Pike, I.H.. 1994. Marine Products For Aquaculture The Future. Internacional Association Of Fish Meal Manufacturers. En: Memorias del 2o. Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Nuevo León, Mexico.
- Pineda, J.C. 1994. Micronutrientes antioxidantes, un nuevo enfoque en la prevención de enfermedades. Tecnología de alimentos vol 29 No 3-4:40-46.
- Secretaría de Pesca. 1993. Anuario Estadístico de Pesca. Secretaría de Pesca. México, pp. 74.
- Secretaría de Pesca. 1994. El sector pesquero en México. Secretaría de Pesca. México, pp. 20.
- Stephan, G., J. Guillaume, F. Lamour. Lipid Peroxidation in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Tissue: Effect of Dietary Vitamin E and Dietary n-6 or n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Aquaculture*, 130: 251-268.
- Sunde, R.A. and Hoekstra, W.G. 1980. Incorporation of selenium from selenite and selenocysteine into glutathione peroxidase in the isolated perfused rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 93:1181.
- Sunde, R.A. 1990. Molecular biology of selenoproteins. *Annu Rev Nutr.* 10:451-474.
- Tacon, A. G. J.. 1989. Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados. Manual de Capacitación. Programa cooperativo gubernamental. Documento de campo No. 4. Proyecto Aquila II GCP/RLA/102 ITA. FAO Italia. pp. 3250.
- Vargas-Albores, F. and J. L. Ochoa 1992. Variation of pH, osmolality, sodium and potassium concentration in the hemolymph of sub-adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* according to size. *Comp. Biochem. Physiol.*
- Viarengo, A., Canesi, Pertica and Livingstone. 1991. Seasonal variation in the antioxidant defence system and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp. Bioch. Physiol. C.* vol 100c No. 1-2:187-190.
- Yu, B. P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews* vol 74 No. 1.

X. ANEXOS

Anexo 1.
Material y Equipo.

1.- Muestras

Solución anticoagulante:
450mM de NaCl
10mM de EDTA Na₂
10mM de HEPES

Centrífuga (2,000 rpm)

Dializador
TBS
1mM de CaCl₂

2.- Actividad de glutatión peroxidasa (GPX):

Espectofotómetro

Cubetas de cuarzo de 1ml de volumen, 1cm de longitud y 3mm de espesor
Baño María de 25°C.

A) Stock de KH₂PO₄•6mM EDTA 0.2M:

27.2g KH₂PO₄
2.23g EDTA disódica
Aforar a 1l con agua destilada.

B) Stock de K₂HPO₄•6mM EDTA 0.2M:

34.8g K₂HPO₄
2.23 g EDTA disódica
Aforar a 1l con agua destilada.

C) Buffer de fosfato 0.2M, pH 7.0 para el ensayo de GPx:

39 volúmenes del stock de KH₂PO₄•6mM EDTA 0.2M
61 volúmenes del stock de K₂HPO₄•6mM EDTA 0.2M

D) Buffer 0.02M, pH 7.0

Diluir el buffer de fosfato 0.2M (GPx) 1/10 con agua destilada.

E) NaN₃ 0.01M:

65mg de NaN₃
Aforar hasta 100ml con agua destilada.

F) GSH 40mM:

61.5mg de glutatión (G-4251)
Disolver en 5.0ml del buffer 0.02M. pH 7.0
Se deberá guardar en frío (hielo) hasta su uso.

- G) NADPH 1mM:
2mg de NADPH (N-6505)
Disolver en 1.8ml del buffer 0.02M
Se deberá guardar en frío (hielo) hasta su uso.
- H) H₂O₂ 12mM:
0.124ml de H₂O₂ al 30%
Aforar a 100ml con agua destilada.
- I) Glutación reductasa 10 EU/ml:
Diluir el stock concentrado de GSH a 10 EU/ml usando
5mM conteniendo 2mg/ml de BSA (Bovine Serum Albumin).
Preparando sólo el necesario y manteniéndolo en hielo.
- J) Solución doble de Drabkin:
2g de bicarbonato de sodio
104mg de potasio cianico
396mg de potasio ferricianico
Disolver en 1l de agua destilada.

3.- Ensayo de glutación reductasa.

- K) NaH₂PO₄.H₂O 0.3M:
41.39g de NaH₂PO₄
Aforar a 1l con agua destilada.
- L) Na₂HPO₄ 0.3M
42.59g de NaH₂PO₄
Aforar a 1l con agua destilada
- M) Buffer GSH reductasa de fosfato sódico 0.3M, pH 7.6
13 volúmenes de NaH₂PO₄.H₂O 0.3M
87 volúmenes de Na₂HPO₄ 0.3M
- N) Buffer diálisis de fosfato potásico 5mM, pH 7.6:
50ml de KH₂PO₄ 5mM + EDTA 0.5mM
450ml de K₂HPO₄ 5mM + EDTA 0.5mM
- O) KH₂PO₄ 5mM + EDTA 0.5mM:
5ml de KH₂PO₄ 0.2M
26mg de EDTA disódica
Aforar a 200ml con agua destilada.

P) K_2HPO_4 5mM + EDTA 0.5mM:

25ml de K_2HPO_4 0.2M

130mg de EDTA disódica

Aforar a 1l con agua destilada.

Q) Buffer diluido de GSH reductasa 5mM, pH 7.6 con 2mg de BSA/ml:

200mg BSA

100ml de buffer de fosfato potásico 5mM, pH 7.6

Almacenar a 4°C

R) EDTA 0.03M

1.12g de EDTA disódica

Aforar a 100ml con agua destilada.

S) BSA 10mg/ml

100mg de BSA (Bovine Serum Albumina)

Sprinkle en 5ml de NaCl al 0.9% en un vial de 20ml, al disolverse se adicionarán

5ml de NaCl al 0.9%. Almacenar a -20 C

T) GSSG 300mM

367.2mg de GSSG (glutación oxidada)

Adicionar 0.8ml de agua destilada para disolver.

El pH se debe ajustar a 7.5 con NaOH 1N

Se deberá aforar a 2ml.

U) Stock de glutación reductasa.

Glutación reductasa (G-4751, tipo III)

Hacer una suspensión en $(NH_4)_2SO_4$ 3.6M.

Se dializará por 24h con dos cambios de 250ml de buffer de fosfato de sodio para diálisis, pH 7.6 conteniendo $10^{-3}M$ de EDTA.

Todas las diluciones se deberán hacer en dilución de buffer de fosfato de sodio 5mM (pH 7.6 con 2mg/ml de BSA).

Anexo 2. Metodología.

Se utilizará hemolinfa de camarones sanos, de cultivo y en estadio de intermuda. Se utilizará solución anticoagulante con pH 7.3 850 mOsm/Kg (El pH, la osmolalidad, la concentración de sodio y de potasio son equivalentes a la de la hemolinfa del camarón) (Vargas-Alvares and Ochoa, 1992).

Los microlitros así obtenidos de hemolinfa serán centrifugados por 10 min. a 10°C a 2,000 rpm; el sobrenadante o plasma será utilizado y el resto descartado.

Debido a que la osmolalidad de la hemolinfa es alta y a la presencia de EDTA en el anticoagulante, será necesario dializar el plasma de camarón para poder usarle, por lo que el serum se dializará por 12h contra TBS conteniendo 1mM de CaCl₂ y clarificado por ultracentrifugación a 40,000 rpm por 20min a 10° C.

Preparación de las muestras en el ensayo de glutatión peroxidasa:

Las muestras serán homogeneizadas y diluidas a concentración adecuada para el ensayo. Muestras con baja actividad serán aquellas en que la turbidez a una A₃₄₀ sea cercana a 1.0, las muestras serán centrifugadas por 30 min. a 20,000 xg en centrífuga refrigerada. Al sobrenadante se le volverá a medir la actividad. Cuando la actividad sea muy alta se hemolizará y diluirá en agua, en baja actividad se hemolizará en la solución doble de Drabkin y diluida en agua para reducir la absorbancia en 340nm (*Lawrence et al.*, 1974).

Anexo 3.

Método del ensayo de glutatión peroxidasa:

- 1.- Serán colocados en cada cubeta las siguientes soluciones:
 - 500ml de buffer de fosfato 0.2M del ensayo GPX
 - 100ml de NaN 10mM
 - 100ml de NADPH 1mM
 - 100ml de GSH (10 EU/ml)
 - 50ml de GSH 40mM
 - 140ml de muestra diluida.
- 2.- Los reactivos serán mezclados.
- 3.- Se incubarán las cubetas a 20°C por 5-7min en baño maría.
- 4.- Para empezar la reacción se utilizarán pipetas automáticas para adicionar rápidamente 10ml de H₂O₂ 12mM
- 5.- Se mezclará inmediatamente después
- 6.- Se repetirán los pasos para las siguientes muestras.

Lectura en el espectrofotómetro:

La reacción enzimática se llevará a cabo en las cubetas de cuarzo y puestas en baño maría a 25°C ± 1°C. Estas reacciones son dependientes de la temperatura. Las reacciones serán monitoreadas siguiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm (A₃₄₀). El blanco a utilizar será agua destilada (140 ml de agua sin muestra). La lectura de el blanco deberá de ser menor de 0.6-0.7 debido a la adición de H₂O₂.

Si la lectura es menor de 0.6 para el NADPH o GSH se deberá de repetir nuevamente.

Las unidades enzimáticas serán calculadas como mmoles de GPX oxidizado por minuto usando un coeficiente molar de 6.22x10³ para NADPH.

Anexo 4

Método del ensayo de glutatión reductasa:

Este ensayo es necesario para cuantificar la cantidad de glutatión reductasa (GSH reductasa). La enzima es almacenada en concentrado y diluida a 10 EU/ml para su uso en el ensayo de Gpx (Massey and Williams, 1965).

1.- Diluir el stock de GSH reductasa dializada en 1/501 en buffer reductasa 0.3M (10ml de reductasa + 5ml de buffer).

2.- Adicionar en cada cubeta del espectro

100 ml de buffer de fosfato de sodio 0.3M del ensayo de GSH reductasa

100 ml de EDTA 30mM

200ml BSA 10mg/ml

100ml NADPH 1mM

100ml GSH reductasa (dilución 1/501)

390 ml agua destilada.

3.- Mezclar el contenido.

4.- Incubar las cubetas por 5-7 min en baño maría a 25°C

5.- Lectura del blanco a A_{340} , deberá ser de 0.6-0.7

6.-Para empezar la reacción, se deberá usar pipeta automática para una rápida adición de los 10ml de GSSH 300mM.

7.- Mezclar inmediatamente.

8.- Iniciar la lectura colocando en los compartimentos las cubetas a A_{340} por 3min.

9.- Repetir para la siguiente lectura.

Las reacciones no enzimáticas de GSSH y NADPH son cero.

Una unidad enzimática es definida como 1mmol de NADPH oxidado por minuto, usando un coeficiente molar de 6.22×10^3 para NADPH.

$$\text{Actividad} = \frac{A_{340\text{nm}}}{\text{min}} * \frac{1 \text{ mol NADPH}}{6.22 * 10^3 * A_{340\text{nm}} * 1} * \frac{11}{10^3 \text{ ml}} * \frac{\text{vol rx}}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{2 \text{ mol GSHox}}{1 \text{ mol NADPH}} * \frac{10^6 \mu\text{moles GSH}}{1 \text{ mol GSH}}$$

Se deben ir eliminando los valores iguales

$$= \frac{A_{340\text{nm}}}{\text{min}} * \frac{1 \text{ mol NADPH}}{6.22 * 10^3 * 1} * \frac{11}{10^3 \text{ ml}} * \frac{\text{vol rx}}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{2 \text{ mol GSHox}}{1 \text{ mol NADPH}} * \frac{10^6 \mu\text{moles GSH}}{1 \text{ mol GSH}}$$

145883

$$= \frac{\quad}{\text{min}} * \frac{\quad}{6.22 * 10^3 * l} * \frac{1l}{10^3 \text{ ml}} * \frac{\text{vol rx}}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{2 \text{ mol GSHox}}{1 \text{ mol GSH}} * \frac{10^6 \mu\text{moles GSH}}{1 \text{ mol GSH}}$$

$$= \frac{\quad}{\text{min}} * \frac{\quad}{6.22 * l} * \frac{1l}{10^3 \text{ ml}} * \frac{\text{vol rx}}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{2 \text{ mol GSHox}}{1 \text{ mol GSH}} * \frac{\quad}{1 \text{ mol GSH}}$$

$$= \frac{\quad}{\text{min}} * \frac{\quad}{6.22} * \frac{\text{vol rx}}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{2 \text{ mol GSHox}}{1 \text{ mol GSH}} * \frac{\quad}{1 \text{ mol GSH}}$$

$$= \frac{\quad}{\text{min}} * \frac{\quad}{6.22} * \frac{\text{vol rx}}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{1 \text{ mol GSHox}}{1}$$

Quedando:

$$= \frac{1}{\text{min}} * \frac{1}{6.22} * \frac{\text{vol rx}}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{1 \text{ mol GSHox}}{1}$$

Es decir:

$$= \frac{1}{\text{min}} * \frac{1}{6.22} * \frac{1}{0.1 \text{ ml mtra.}} * \frac{\text{vol rx}}{1} * \frac{1 \text{ mol GSHox}}{1}$$

En donde:

$$= \frac{1}{6.22} * \frac{1}{0.1 \text{ ml mtra.}} = \text{Es el factor de concentración.}$$

y

$$= \frac{\text{vol rx}}{1} = \text{Es el factor de dilución} = \frac{5010 \mu\text{l de volumen}}{10 \mu\text{l mtra. (cantidad de enzima)}} = 501$$

La fórmula para trabajar es:

$$\text{Unidades totales} = (\text{factor de dilución}) * (\text{factor de concentración}) * (A_{340\text{nm}}) * 2$$

Se multiplica por 2 ya que en la estequiometría de reacción son formados 2 moles de GSH por cada mol de NADPH oxidado.

$$\text{Unidades totales} = \mu\text{moles de GSHox/min/ml}$$

$$\text{Unidades enzimáticas} = \mu\text{moles de GSHox/min}$$

$$\text{UE/ml} = \mu\text{moles de GSHox/min/ml}$$

El factor de concentración para las muestras será de

$$= \frac{1}{6.22} * \frac{1}{0.1 \text{ ml mtra.}} = 1.6077$$

mientras que para el blanco será de

$$= \frac{1}{6.22} * \frac{1}{0.14 \text{ ml mtra.}} = 1.1483$$

La diferencia entre el factor de concentración de la muestra y del blanco se debe a que se utiliza la misma técnica, es decir:

500 microlitros	0.2M buffer del ensayo GPx fosfato
100 microlitros	10mM NaN ₃
100 microlitros	1mM NADPH
100 microlitros	GSHred (con 10UE/ml)
50 microlitros	40mM GSH
100 microlitros	Muestra ó agua
40 microlitros	de agua

Anexo 5.

Determinación de proteína total por el método de Lowry.
Modern Experimental Biochemistry, Rodney F. Boyer, 292-299

BSA 0.1 mg/ml en agua.

Solución A: CuSO₄, 1% en agua

Solución B: Na₂CO₃, 2% en 0.1M NaOH

Solución C: Tartrato de sodio 2% en agua

Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N

Preparación de la solución alcalina de sulfato de cobre:

Transferir 1.0ml de la solución C en un frasco Erlenmeyer de 125ml. Adicionar 1.0 ml de la solución A y 98.0 ml de la solución B. Mezclar al estar adicionando. Esta solución se mantiene estable por 24 h.

Adicionar 5.0 ml de la solución alcalina de sulfato de cobre a cada tubo y mezclar con vortex. Reposar por 10 min a temperatura ambiente. Adicionar 0.25ml del reactivo de Folin y mezclar. Después de 30 min se lee en el espectro a 540 nm.

Rx	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
Agua	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0.7	0.7	0.4	0.4
BSA	----	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	----	----	----	----
Muestr	----	----	----	----	----	----	0.3	0.3	0.6	0.6
Sol Alc	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Folin	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

El tubo 1 es el blanco, del 2 al 6 son para la curva estándar y del 7 al 10 son muestras en duplicado

Solución alcalina de sulfato de cobre:

Reactivos:	Original	Probabilidad 1	Probabilidad 2
Solución A	1.0 ml	0.5 ml	0.25 ml
Solución B	98.0 ml	49.0 ml	24.50 ml
Solución C	1.0 ml	0.5 ml	0.25 ml
Total	100 ml	50.0 ml	25.00 ml

Determinación de proteína total; método de Lowry:

Reactivos:	Original	Probabilidad 1	Probabilidad 2
Muestra	1.000 ml	0.160 ml	0.200 ml
Sol. Alcalina	5.000 ml	0.800 ml	1.000 ml
Rx Folin	0.250 ml	0.040 ml	0.050 ml
Total	6.250 ml	1.000 ml	1.250 ml

