



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR

ACUACULTURA

---

"ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA OSMOLARIDAD DE LA  
HEMOLINFA EN EL CAMARON MARINO PENAEUS VANNAMEI"

TESIS DE GRADO

PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE:

ACUICULTOR

PRESENTADA POR:

**Luis Fernando Chávez Negrete**

---

GUAYAQUIL - ECUADOR

1989



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

#### AGRADECIMIENTO

Agradezco a Tom Bell del Environmental Research Laboratory of Tucson, Arizona cuya asistencia dió las bases para realizar la presente investigación.

También al Dr. Nicolás Campaña, Director de Tesis, cuya visualización de los procesos bioquímicos fundamentales fué de invalorable ayuda.

Agradezco al Dr. Julio Plaza por el uso de su equipo de medición especializado.

Por último agradezco al Centro de Producción Acuícola MARLAGO del Ing. Eduardo Gomez, cuyas instalaciones fueron el centro de desarrollo y procesamiento de la presente tesis.

DEDICATORIA

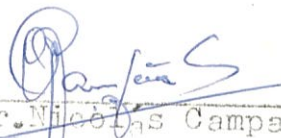


BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

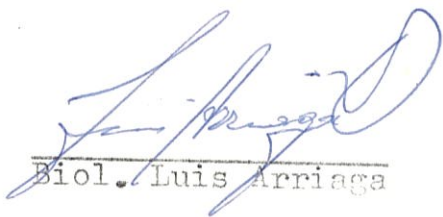
A LOS FUTUROS ACUACULTORES DEL  
ECUADOR




Ing. Jorge Faytong  
DECANO



Dr. Nicolás Campaña  
Director de Tesis



Biol. Luis Arriaga



Kc. Henry Alvarez

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma , a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



.....

LUIS FERNANDO CHAVEZ NEGRETE

## RESUMEN

El hecho de intentar de cualquier manera manipular a organismos vivos requiere de un entendimiento detallado de los fenómenos metabólicos que gobiernan los procesos funcionales de ~~todo~~ el animal.

Una comparación de la osmolaridad, iones Cl<sup>-</sup> e iones Na<sup>+</sup> entre el suero hemolinfático y el medio ambiente, a diferentes salinidades, se llevó a cabo con el P. Vannamei. El peso de los ejemplares fué de 12.2 +/- 2.4 gramos dentro de una temperatura de 26.4 +/- 1.6 grados Celsius.

Los resultados mostraron que el P. vannamei mantiene relativamente constante su presión osmótica linfática, haciéndolo un especie homioosmótica eurihalina. El comportamiento es aparentemente lineal regido por la ecuación :

$$O(h) = O(a) \times 0.123 + 638.11 \quad (r = 0.66)$$

$$O(h) = \text{OSMOLARIDAD HEMOLINFATICA}$$

$$O(a) = \text{OSMOLARIDAD DEL AGUA}$$

El punto isosmótico se encuentra en una salinidad de 25.9 ppt, mostrando una regulación hiperosmótica por debajo de 25.9 ppt y una regulación hiposmótica por encima de 26 ppt.

Los datos de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  muestran que la regulación parece estar a cargo de los cloruros mostrando un comportamiento similar a la osmolaridad.

Se encontró una relación entre la salinidad del agua y la osmolaridad de la misma de :

$$\text{OSMOLARIDAD DEL AGUA} = \text{SALINIDAD} \times 26.48 + 42.36 \quad (r = 0.999)$$

## INDICE GENERAL

Pág.

RESUMEN .....	
INDICE GENERAL .....	
INDICE DE GRAFICOS .....	
INDICE DE TABLAS .....	
INTRODUCCION .....	
I. GENERALIDADES .....	
1.1 Antecedentes .....	
II. FENOMENO DE OSMOSIS .....	
2.1 Definición .....	
2.2 Procesos Osmóticos en membranas naturales .....	
2.2.1 El Equilibrio Gibbs-Donnan .....	
2.2.2 Transporte activo .....	
2.3 Efectores Osmóticos .....	
2.3.1 Concentraciones iónicas .....	
2.3.2 Substancias proteínicas .....	
2.4 Osmolaridad y Osmolalidad .....	
2.4.1 Definición .....	



	2.4.2	Método de análisis por Crioscopia .....	
III.		HEMOLINFA .....	
	3.1	Principales constituyentes iónicos .....	
	3.2	Papel fisiológica .....	
	3.3	Método de extracción y conservación .....	
	3.4	Osmolaridad de la hemolinfa .....	
IV.		PROCESOS OSMOTICOS EN CRUSTACEOS .....	
	4.1	Procesos osmóticos en Penaeidos .....	
	4.1.1	Estado actual de los conocimientos de osmoregulación .....	
	4.1.2	Papel osmoregulador de la orina y branquias .....	
V.		RECOLECCION DE DATOS .....	
	5.1	Mediciones de la osmolaridad de la hemolinfa a diferentes salinidades .....	
	5.2	Mediciones de la osmolaridad del agua a diferentes salinidades .....	
	5.3	Relación matemática entre la osmolaridad del agua y la osmolaridad de la hemolinfa ..	
	5.4	Rangos hipertónicos de la hemolinfa .....	
	5.5	Rangos hipotónicos de la hemolinfa .....	
	5.6	Rangos de iso-osmocidad .....	
VI.		CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	
		APENDICE .....	
		BIBLIOGRAFIA .....	

## INDICE DE GRAFICOS

1. Osmolaridad del agua vs. salinidad del agua .....
2. Osmolaridad de la hemolinfa vs. Osmolaridad del agua .....
3. Cloruros y Sodio hemolinfático vs. Cloruro y Sodio del agua .....



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA

## INDICE DE TABLAS

1. Datos de salinidad y osmolaridad del agua .....
2. Concentraciones de cloruros del agua y de la hemolinfa .....
3. Concentraciones de Sodio del agua y de la hemolinfa .....
4. Datos de la osmolaridad del agua y de la hemolinfa .....

## INTRODUCCION

La actividad camaronera se desarrolló en una forma explosiva en nuestro país. El "boom" camaronero no dió tiempo para pensar, desarrollar, optimizar; tan sólo para invertir. El medio era propicio: facilidades de crédito, bajos costos de producción y precios internacionales que permitían una alta rentabilidad.

Hoy en día las cosas han cambiado; la carencia de créditos, altos costos de producción e incluso precios de camarón iguales o menores de los de hace algunos años, hacen del cultivo del camarón en nuestro país una actividad tambaleante y de alto riesgo. Estamos en la necesidad de optimizar cada sucre. Una alta eficiencia técnica y administrativa conjuntamente con un mayor conocimiento del organismo cultivado, en nuestro caso el P.vannamei, es la única manera de superar la crisis.

La importancia de conocer a nuestra especie de cultivo es

sin lugar a dudas un paso vital. Necesitamos dominar las áreas de mayor incidencia sobre la producción (fuera de la parte genética):

- (1) su alimentación (NUTRICION)
- (2) su ambiente (ECOLOGIA)
- (3) su salud (PATOLOGIA)

El campo de la nutrición está siendo desarrollado muy rápidamente. Si bien es cierto que la mayoría de los estudios son referentes a otras especies, el interés general por esta área está cada día en aumento. La patología de crustáceos, aunque una área relativamente joven, está siendo desarrollada por varios centros de investigación en varios continentes y sus técnicas y tratamientos están siendo aplicados mundialmente. Pero existe un área muy particular para cada especie y ésta es el ambiente en el cual se desarrolla y las interacciones con el mismo.

Es el objetivo de este trabajo <sup>es</sup> explorar las implicaciones fisiológicas que puede tener el medio ambiente sobre el P.vannamei. Se sabe que existen camarонерías que operan desde casi 0ppt de salinidad hasta 55ppt o más. Existe mucha controversia acerca de cuál será la salinidad óptima de crecimiento. Pero quién dice que tiene que haber una salinidad óptima? Por qué no puede haber 2 o 3 diferentes salinidades según el tamaño y época del año? Hasta hay

indicios que los choques de salinidad desencadenan cierto crecimiento. La presente investigación no tiene como objetivo dar respuesta a estas incógnitas, pero sí el iniciar estudios preliminares que nos lleven a clarificar el funcionamiento de nuestra especie; que nos permita indagar y extraer información que refleje lo que esta sucediendo dentro del camarón.

Si al culminar el presente estudio sólo quedamos con más preguntas y más incógnitas, se habrá cumplido el objetivo.



**BIBLIOTECA**  
**FAC. ING.**  
**MARITIMA**

## CAPITULO I

### GENERALIDADES

#### 1.1 ANTECEDENTES

La propiedad más significativa del agua de mar en relación con la ecología y fisiología de los organismos, es su compleja mezcla de sales. En los sistemas vivientes acuáticos el principal problema es el mantenimiento de una concentración óptima de agua y sales de los fluidos corporales a través de la osmoregulación.

Algunas áreas de las membranas corporales pueden ser osmóticamente inactivas, disminuyendo la sección transversal total disponible a procesos osmóticos. También puede ocurrir que la membrana sea capaz de seleccionar ciertos electrolitos y retener otros, y

hasta en algunos casos operar en contra del gradiente de difusión.

El P.vannamei es una especie de camarón marino que necesita de los ambientes estuarinos para completar su ciclo vital. Este hecho refleja la necesidad de soportar cambios drásticos de salinidad y composición química del agua. La capacidad de mantener un volumen celular apropiado, es un prerequisite esencial para el establecimiento de comunidades en medios de salinidad fluctuante.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARITIMA



## CAPITULO II

### FENOMENO DE OSMOSIS

#### 2.1 Definicion

La substancia más abundante para difundir a través de la membrana celular es el agua, pero debe recordarse que difunde bastante agua en circunstancias normales en ambos sentidos a través de la membrana celular. De todas maneras, normalmente la cantidad que difunde en ambas direcciones esta tan precisamente equilibrada que no se produce la menor difusión neta de agua. En consecuencia , el volumen de la célula se conserva constante. De todas formas, en determinadas circunstancias puede desarrollarse un gradiente de concentración para el agua a través de la membrana, de la misma manera que pueden producirse otros gradientes de concentración para otras substancias. Cuando esto

ocurre tiene lugar una difusión neta de agua por ~~de~~ la membrana celular, haciendo que la célula aumente de volumen o se retraiga, según la dirección de la difusión neta. Este proceso de difusión de agua dependiente de un gradiente de concentración se denomina ósmosis. La presión opuesta necesaria para detener el flujo neto de agua causado por ósmosis se denomina presión osmótica.\*

## 2.2 Procesos Osmóticos en Membranas Naturales

La presión osmótica ejercida por partículas no difusibles en una solución, tanto si se trata de moléculas como de iones, depende del número de partículas por unidad de volumen de líquido, no de la masa de dichas partículas. El motivo de ello es que cada partícula en una solución, sea cual fuere su masa, ejerce en promedio la misma presión contra la membrana. En otras palabras, todas las partículas están chocando unas contra otras con igual energía. Si algunas partículas tienen mayor energía cinética de movimiento que otras, su impacto con las partículas de poca energía les proporciona parte de su energía, con lo cual disminuye el nivel energético de las partículas que tienen mucha energía mientras aumenta el nivel energético de las demás.

### 2.2.1 El equilibrio Gibbs-Donnan

Entre la célula y el medio que la rodea puede distinguirse dos compartimientos separados por la membrana celular. Uno es el medio intracelular y el otro es el medio extracelular. Definidas las condiciones que rigen la distribución en equilibrio de un soluto entre dos compartimientos, es posible analizar las consecuencias de una condición en la cual todos los iones están distribuidos entre la célula y el medio en estado de equilibrio termodinámico. Para ello es necesario considerar que el medio intracelular contiene sustancias, como proteínas, ácidos nucleicos, esteres fosfóricos, etc. que a un pH fisiológico tienen carga neta negativa y que, por su tamaño, no atraviesan la membrana celular. Por esta razón, en primera aproximación, la distribución iónica celular en equilibrio termodinámico puede encararse estudiando la distribución de iones entre dos compartimientos, uno de los cuales contiene aniones que no atraviesan la membrana. En estas condiciones, los iones difusibles se distribuyen entre ambos compartimientos y alcanzan un estado de equilibrio que se denomina equilibrio Gibbs-Donnan.

Una de las consecuencias del equilibrio Gibbs-Donnan es que se establece un potencial de membrana tal que el compartimiento que contiene el anión no difusible se hace electronegativo en relación con el otro. La otra consecuencia es que la concentración total de iones difusibles en el compartimiento que contiene el anión no-difusible es mayor que la concentración total de iones difusibles en el otro compartimiento.

La concentración total de solutos en el compartimiento interno será la de los iones difusibles más la del anión no-difusible. Por las consecuencias que este hecho podría tener en la vida celular conviene analizarlo. En efecto, dado que la concentración total de solutos determina la presión osmótica de una solución, cuando los iones se distribuyen en equilibrio Gibbs-Donnan necesariamente se cumple que la presión osmótica en el interior será mayor que la presión osmótica en el exterior.

Como consecuencia de esta desigualdad, el agua tiende espontáneamente a penetrar en el compartimiento interior. Esto altera la concentración de iones difusibles en dicho compartimiento alejándolos del estado de equilibrio Gibbs-Donnan. Los procesos físicos harán volver a los compartimien-

tos a ese estado de equilibrio restableciendo la diferencia de presión osmótica, iniciando un nuevo paso de agua, una nueva redistribución de iones y así indefinidamente. Como consecuencia de este proceso, el compartimiento que contiene el anion no-difusible gana agua progresivamente y su volumen aumenta de manera indefinida. Por lo tanto, si todos los aniones difusibles intracelulares alcanzaran equilibrio termodinámico con los iones presentes en el medio extracelular, una célula no podría mantener constante su volumen, pues ganaría agua hasta distender y romper la membrana celular, con la consiguiente desintegración de la célula por lisis.

La constancia del volumen celular requiere entonces procesos que den lugar a movimientos iónicos que promuevan distribuciones alejadas del estado de equilibrio termodinámico.

### 2.2.2 Transporte Activo

El paso de un soluto a través de una membrana biológica se realiza por transporte activo cuando se demuestra que hubo una transferencia neta de soluto desde un compartimento de alto potencial

electroquímico es menor hasta otro compartimiento donde el potencial electroquímico es mayor.

La distribución final de un soluto sometido a transporte activo es estacionaria. En efecto, dado que no hay membranas totalmente impermeables a los solutos susceptibles de ser transportados pasivamente, la diferencia de potencial electroquímico generada por el transporte activo tiende a disiparse por transporte pasivo. De esa manera se alcanza una distribución estacionaria de soluto en que la velocidad de transferencia activa iguala la de transferencia pasiva. La conservación de esa distribución estacionaria requiere el suministro continuo de substrato a la fuente de energía. En una célula este suministro lo hace el metabolismo. El transporte activo, por lo tanto, depende del metabolismo celular para la provisión del substrato de la fuente de energía.

## 2.3 Efectores Osmóticos

Principalmente son de origen iónico y protéico.

### 2.3.1 Concentraciones Iónicas

Las concentraciones iónicas van a tener incidencia directa sobre la osmolaridad por comprender

partículas en el medio. El efecto de cada ión sobre la ósmosis de las membranas requiere un estudio más profundo y complejo fuera del alcance de este trabajo.

### 2.3.2 Substancias Proteínicas

Las sustancias proteínicas también van a jugar un papel importante dentro de la ósmolaridad intracelular mediante la disposición de aminoácidos específicos. Debido a que el presente estudio se concentra en los contenidos osmóticos del suero, no formará parte de las relaciones dichas sustancias proteínicas.

## 2.4 Osmolaridad y Osmolalidad

### 2.4.1 Definición

Como la intensidad de la presión osmótica producida por un soluto es proporcional a la concentración del mismo en número de moléculas o iones, expresar la concentración del soluto en masa carece de valor para indicar la presión osmótica. Para poder expresar la concentración de moléculas osmóticas según el número de las parti-

culas, se utiliza la unidad denominada osmol en lugar del gramo.

Un osmol es el número de partículas (moléculas) en el peso molecular, en gramos, de soluto no disociado. Una solución que tiene un osmol de soluto disuelto por Kg de agua dicese que tiene concentración de un osmol por Kg, y una solución que tiene 1/1000 osmol disuelto por Kg tiene una concentración de un miliósmol por Kg (mOsm/Kg).

Dada la dificultad para medir kilogramos de agua en una solución, cuando se habla de las características osmóticas de los líquidos corporales suele emplearse otro término, osmolaridad, que es la concentración osmolar expresada como osmoles por litro de solución, mas bien que osmoles por kilogramo de agua. Aunque hablando en propiedad son los osmoles por kg de agua (osmolalidad) los que establecen la intensidad de la osmósis, de todas maneras, las diferencias cuantitativas entre osmolaridad y osmolalidad son menores del 1%. Como es mucho más práctico utilizar el término "osmolaridad" que el término "osmolalidad", suele emplearse en casi todos los estudios fisiológicos.



#### 2.4.2 Método de Análisis por Crioscopia

El instrumento que se usa se llama osmómetro y la medición funciona por análisis crioscópico (punto de congelación) de la muestra. Las variaciones en el punto de congelación de la solución depende solamente del número de partículas disueltas (es decir su concentración osmótica u osmolalidad) y no de su tamaño o forma. Esta es la razón por la que se usa la medición del descenso del punto de congelación para determinar la osmolalidad de una solución. Un osmómetro consta esencialmente de:

1. Un baño refrigerado para contener, enfriar y congelar líquidos orgánicos o de otro tipo.
2. Un termistor eléctrico para medir la temperatura.
3. Un galvanómetro y un puente de Wheatstone para convertir las variaciones de la temperatura en unidades calibradas de osmolalidad.

La muestra se enfría varios grados por debajo del punto de congelación y entonces se hace vibrar intensamente durante un momento. Esto es causa de

que se formen muchos cristales de hielo que libe-  
ran su calor de fusión . El calor no puede ser  
transmitido inmediatamente al baño de etilengli-  
col circundante y el calor captado se mezcla por  
parte de las nuevas partículas de congelación. La  
muestra permanece en equilibrio de temperatura  
por algunos minutos, mientras el hielo se conge-  
la. Durante este tiempo se realiza la medición de  
la temperatura.

La resistencia eléctrica de la sonda del termis-  
tor varia directamente con la temperatura de la  
muestra. La resistencia eléctrica del termistor es  
también directamente proporcional a la osmolali-  
dad de la muestra, por consiguiente la resisten-  
cia variable de la esfera del Puente de Wheat-  
stone puede ser calibrada en miliosmoles por Kg  
(mOsm/Kg) de la muestra. Cuanto mayor es la con-  
centración de solutos en la solución, mas baja es  
la temperatura, mayor la resistencia eléctrica y  
mas elevada la lectura de osmolalidad.

Especificaciones del Osmómetro:

MARCA: Fiske Associates

MODELO: OS

VOLTAJE: 115

FRECUENCIA: 50-60 Hz

AMPERIOS: 1.6 amps 200 watts

TAMANO DE MUESTRA: 0.25 ml - 2.0 ml

UNIDADES DE LECTURA: mOsm/Kg

REPRODUCIBILIDAD: para muestra de 0.25 ml = +/-1%

RANGO: 0-4000 mOsm/Kg

RANGO DEL BANO DE TEMPERATURA: +10 hasta -15  
grados Celsius controlado a +/- 1 grado Celsius.

Además de la osmolaridad se tomará datos complementarios de iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. El Na se medirá mediante un fotómetro de llama modelo Il 143. El Cl se medirá con un espectrómetro.



BIBLIOTECA  
FAC. ING.  
MARÍTIMA

### CAPITULO III

#### HEMOLINFA

Mediciones de presión de vapor y puntos de congelación sanguíneos de muchos crustáceos muestran, con una desviación de 1-2%, que sus fluidos hemolinfáticos contienen una concentración total de iones y otras partículas activamente osmóticas idénticas al las del agua de mar. En la mayoría de los crustáceos marinos el plasma sanguíneo y el ambiente marino están esencialmente en equilibrio osmótico a través de las membranas permeables del animal como las branquias. Este estado podría ser un efecto del equilibrio Donnan debido a la alta concentración de proteínas presentes en la sangre conjuntamente con membranas limitantes que son permeables a los iones pero no así con las proteínas. Pero este equilibrio pasivo no ocurre en alrededor de 14 decapodos estudiados. Todos muestran una concentración iónica diferente a la que se podría esperar de un transporte pasivo o un fenómeno de Donnan. Esto quiere decir que

definitivamente se está dando una regulación iónica activa con su consecuente gasto de energía metabólica.

### 3.1 Principales Constituyentes Iónicos

En una comparación de la composición inorgánica de la sangre de crustáceos marinos y de agua dulce (Waterman 1960), se demostró que el Cloro ocupa entre el 77% y el 97% de los aniones totales y que el Sodio ocupa entre el 77% y 92% de cationes totales.

### 3.2 Papel Fisiológico

Los iones inorgánicos van a incidir sobre procesos fisiológicos. El contenido iónico de una especie variará según el género y concentraciones ambientales. Estas variaciones tendrán un efecto sobre órganos vitales como el corazón. Tanto la molaridad total como las proporciones iónicas son importantes. Una reducción en la molaridad causa un incremento en la actividad cardíaca y eventualmente un arresto sistólico. Incrementos en la molaridad causa decrecimiento de la actividad y un arresto diastólico que puede ser irreversible.

El  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Cl}^-$  parecen ser los iones más importantes en estudios hechos con crawfish y langostas. Un exceso de  $\text{Na}^+$  causa un incremento en el ritmo cardíaco

y su amplitud, y cuando es el único catión presente (NaCl isotónico), causa eventualmente fatiga y un arresto cardíaco especialmente sistólico. Bajos niveles de Na<sup>+</sup> causa una disminución en la frecuencia, y la ausencia de Na<sup>+</sup>, el arresto diastólico. Un alto nivel de K<sup>+</sup> causa un decrecimiento en la frecuencia, incremento en el tono y amplitud del pulso y eventualmente el arresto sistólico.

Otra gran importancia del contenido iónico es en la forma que pueda incidir sobre la digestión. Se ha encontrado que en los jugos digestivos del Aztacus sp los iones inorgánicos prominentes son el Na<sup>+</sup>(1%) y Cl<sup>-</sup>(0.5%). El Cl<sup>-</sup> activa la amilasa que es una enzima digestiva.

Para poder decidir si las diferencias de composición iónica entre el agua y la hemolinfa son debidas a una regulación activa o a equilibrios iónicos tipo Donnan (Robertson) se efectuaron pruebas mediante muestreos de sangre y la dialización de las mismas con agua de mar llegando a un equilibrio pasivo a través de membranas permeables a iones pero no a las proteínas. Los resultados demostraron que todos los animales muestreados utilizan la regulación iónica. Casi sin excepción, dicha regulación consistía en mantener los niveles de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca superiores a los del agua de mar; en cuanto a los

niveles de magnesio y sulfato, estos eran mantenidos por debajo de las concentraciones de agua de mar. El Cl<sup>-</sup> se mantuvo siempre cerca de equilibrio. Los decápodos utilizados para esta prueba fueron: Homarus gammarus, Palinurus erephas, Pagurus sp., Dromia vulgaris, Carcinus maeans, Macropipu depurator, Maja squinado y un Stomatopoda (Squilla mantis)

### 3.3 Método de Extracción y Conservación

La extracción de la hemolinfa se efectúa in situ para evitar cualquier variación homeostática debido al transporte y/o confinamiento. Estudios realizados (Balazc 1973) determinaron que especímenes de P. marginatus tenían diferentes niveles de varios constituyentes sanguíneos luego de 10 días de confinamiento.

El método es el empleado y sugerido por el Environmental Research Laboratory de Arizona:

1. Preparar un recipiente de vidrio (tubo de ensayo) y enfriarlo mediante hielo circundante.
2. Previo a extraer la hemolinfa se debe succionar y expulsar el agua destilada por la jeringuilla (insulina 25G 5/8 o 27G 1/2) en varias ocasiones. Al repetir este procedimiento por última ocasión se debe asegurar de expulsar la mayor cantidad posible de agua.

3. Colocar el camarón en posición ventral, con el cefalotorax frente a usted. Secar la base de las branquias y alrededores para evitar cualquier contaminación de agua a la muestra.

Inserte la aguja inmediatamente posterior a la base del quinto periópodo. La aguja deberá estar apuntando hacia usted paralelamente con el eje longitudinal del camarón. En otras palabras, la aguja deberá estar justo debajo de la cutícula y extenderse aproximadamente hasta la base del tercer periópodo. (Fig 1)

4. Sostenga el camarón con firmeza y succione lentamente.
5. Inmediatamente expela la hemolinfa en el tubo de ensayo. Tapar y guardar en hielo para su transporte, dejando coagular la sangre.
6. Utilizando algun instrumento liso e impermeable requiebre el coágulo en la mayor cantidad de trozos posibles.
7. Centrifugar los tubos por aproximadamente 15 minutos a la mayor velocidad posible con un microcentrifuga standard. El coágulo deberá estar ahora cerca del fondo.



8. Extraer el suero sobrenadante y colocarlo en un recipiente limpio.
9. Llevar la muestra al tubo extractor del osmómetro y realizar la medición.

NOTA: Sólo animales en estadio de intermuda serán utilizados para las mediciones. Los animales muestreados fueron de un peso promedio de  $12.17 \pm 2.0$  gramos.

Técnicas de microcentrifugación del suero hemolinfático luego de la coagulación de las proteínas también fueron utilizadas por Castille (1981), Dole y Bayer (1977), Jackson (1981), y Balacs y Oldrich (1972).

También se midió la temperatura como dato complementario ya que esta afecta la actividad reguladora así como el metabolismo en general. La temperatura promedio fue de  $26.4 \pm 1.66$  grados Celsius.

El contenido de sodio y cloruros serán medidos para intentar explicar el comportamiento regulador osmótico y observar como intervienen en este proceso.

### 3.4 Osmolaridad de la Hemolinfa

La osmolaridad de la hemolinfa se considera el efecto

osmótico que producen los efectores osmóticos ya mencionados en el literal 2.3.

## CAPITULO IV

## PROCESOS OSMOTICOS EN CRUSTACEOS

La presión osmótica es uno de los factores externos que afectan al metabolismo de los crustáceos. En un compendio de fisiología de crustáceos editado por Talbot H. Waterman del Departamento de Zoología de la prestigiosa Universidad de Yale, indica que en experimentos realizados para medir el consumo de oxígeno de algunos crustáceos a diferentes salinidades, se registraron aumentos de hasta un 40% cuando estos se encontraban en medios diluidos y un decrecimiento en su consumo de oxígeno cuando estos se hallaban en medios mas concentrados. Entre las especies utilizadas fueron Aztacus aztacus, Carcinus maeans, Metapenaeus monoceros, Eriphia spinifrons, Pagurus longicarpus y Uca spp. El consumo de oxígeno en Ocypode quadrata es mínimo cuando esta especie se encuentra a una salinidad de 25 ppt., coincidente con el punto de isoionicidad de los iones cloruros entre la sangre y el medio ambiente. En algunas poblaciones

de Palaemonetes varians el mínimo consumo de oxígeno se registraba cuando las concentraciones salinas del medio ambiente (25 ppt) igualaban las de la sangre.

Se podría pensar que los incrementos metabólicos se deben al trabajo osmótico requerido en los diferentes medios hipo e hiper-tónicos. Sin embargo Waterman indica que el gasto energético debido al trabajo osmótico sería mucho menor al gasto energético debido a los cambios metabólicos totales involucrados en los experimentos. Estudios comparativos entre Eriocheir y Carcinus demostraron que el principal efecto de un "stress" osmótico sobre las agallas era el grado de hidratación de este tejido y que la absorción de oxígeno estaba directamente relacionado con este último fenómeno.

Algunos crustáceos reaccionan de tal manera a los cambios de salinidad del medio acuático, que sus fluidos corporales se mantienen isosmóticos al ambiente. Estos son llamados crustáceos poikilosmóticos. Otros mantienen (dentro de límites) constante su medio interno a pesar de las variaciones osmóticas del ambiente. Estos en cambio son llamados homoiosmóticos. En cualquiera de los dos casos anotados, el rango de salinidad que el organismo pueda soportar puede ser pequeño (se dice que el animal es estenohalino) o amplio (eurihalino). Los decápodos, particularmente los de agua salobre, por lo general son poikilosmóticos en salini-

dades altas y normales para la especie y homocismótico en bajas salinidades.

Entre otras cosas que podrían estar afectando las concentraciones hemolinfáticas están las enfermedades. Se ha medido que infecciones de Sacculina en Carcinus maenas incrementan la concentración de proteínas,  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  mientras que los niveles de  $Na^{+}$  y  $K^{+}$  permanecen invariables.

#### 4.1 Procesos osmóticos en Penaeidos

Un patrón común en el comportamiento migratorio de camarones marinos eurihalinos es el retorno de los individuos maduros hacia medios más salinos para el apareamiento y desove. Dado a que individuos maduros no son encontrados en medios diluidos, una explicación es que dicha migración sea vital para procesos de maduración, eclosión de los huevos y/o desarrollo larvario.

Algunos crustáceos especializados parecen tener una muy efectiva osmoregulación. En experimentos con Metapenaeus monoceros este mantuvo el cloruro de sodio de su hemolinfa en un valor muy constante en una fluctuación de salinidad de 6-30ppt.

Muchos crustáceos que han invadido exitosamente aguas

salobres, tienen la capacidad de regular la hemolinfa hiperosmótica con respecto al agua salobre, pero en el agua de mar, la hemolinfa se mantiene isosmótica respecto al agua. Los penaeídeos: P. stylirostris, P. setiferus, P. indicus, P. duorarum y P. aztecus y otros, los cuales habitan aguas salobres en estadios de postlarva y de juveniles, pero migran hacia habitats marinos cuando adultos, son hiperosmóticos en aguas salobres e hiposmóticos en agua de mar.

El camarón, al soportar cambios de salinidad, fisiológicamente pasará a través de un periodo de reajuste de volúmenes celulares. En este momento existen transportes activos y pasivos de sodio y potasio a través de las membranas celulares.

El "stress" debido a la salinidad puede convertirse en un factor limitante cuando actua en conjunto con otros factores "estresantes". Una especie que en el laboratorio puede soportar grandes fluctuaciones de salinidad, no podria soportar estos mismos cambios en la naturaleza si estuviesen acompañados de poca disponibilidad de oxígeno, temperaturas inadecuadas, presencia de contaminantes, cambios en la naturaleza física o química del sustrato y cambios en la dieta.

Panikkar indica que bajo salinidad constante, hay un incremento de la presión osmótica hemolinfática si bajamos la temperatura. Williams (1960) trabajando con P. aztecus y P. duorarum demostró que siendo estas especies hipotónicas al agua de mar, tendían hacia la isotonicidad al disminuir la temperatura. Pero aún queda la incógnita de que acaso la tendencia hacia la isotonicidad a bajas temperaturas sea debido una falta de eficiencia de los mecanismos osmoregulatorios o a un incremento en la habilidad de alcanzar el equilibrio.

#### 4.1.1 Estado Actual de los Conocimientos de Osmoregulación

En Penaeus setiferus y P. stylirostris aclimatados a salinidades de 9.8ppt y 10.8ppt respectivamente, se encontraron que los juveniles son mas eficientes reguladores hiperosmóticos e hiperiónicos que los adultos. Sin embargo (Castille y Lawrence 1980) concluyeron que la reducida capacidad regulatoria de los adultos no son suficientes para requerir una migración hacia aguas oceánicas para su sobrevivencia.

A salinidades de 40.4ppt, los juveniles de P. setiferus son más efectivos reguladores hiposmóticos e hipoiónicos que los adultos. Las diferen-

cias en concentración hemolinfática entre el P. setiferus adulto y juvenil a 23.5ppt indican que el punto de isosmocidad e isoionicidad con respecto al medio ambiente se eleva con el grado de maduración del camarón. En cambio para P. stylirostris en salinidades de 36.2ppt, no hay diferencias en cuanto a capacidades osmoregulatorias entre los juveniles y los adultos.

Investigaciones hechas con Metapenaeus monoceros (Panikkar), indican que el comportamiento isosmótico era llevado a cabo por la regulación activa de cloruros, los cuales permanecían relativamente constantes dentro del cuerpo a pesar de grandes fluctuaciones externas de salinidad. Otros investigadores también declaran que la absorción activa de iones, particularmente cloruros, forma una faceta esencial en los procesos adaptativos y que el transporte activo a través de las membranas que separan el medio interno y externo es lo que permite a muchos animales acuáticos mantener un gradiente osmótico.

#### 4.1.2 Papel osmoregulador de la Orina y Branquias

Un punto de contacto entre la hemolinfa y el



medio es la vía urinaria, localizada en la base de la antena llamada glándula antenal. Aunque en la mayoría de los crustáceos estenohalinos y eurihalinos estas glándulas son importantes en la regulación iónica, no son funcionales en la regulación osmótica. Esto se deduce debido a que la composición iónica entre la hemolinfa y el medio ambiente puede variar en pequeñas cantidades, pero ambas permanecen isosmóticas. Castille y Lawrence (1980) comprobaron la ausencia de un gradiente de concentración entre la hemolinfa y la orina del P. setiferus y del P. stylirostris, demostrando que efectivamente las glándulas antenales no funcionan como reguladores osmóticos. Por esta razón el mecanismo primario de osmoregulación en estas especies debe ser la absorción iónica activa en aguas de baja salinidad junto con una excreción iónica activa extrarenal en aguas de alta salinidad. El hecho de producir orina isosmótica a la hemolinfa agrava la tendencia a perder sales en medios hiposmóticos y a perder agua en medios hiperosmóticos.

Las diferencias en cuanto a concentraciones iónicas entre la hemolinfa y la orina son principalmente que la orina contiene una mayor

concentración de iones magnesio y sulfato y una menor concentración de iones calcio y potasio. La pérdida de agua y sales a través de secreciones de la glándula antenal es compensada por el ingreso de agua y sales a través de las branquias; este hecho se puede deducir del peso constante que mantiene el animal como también del hecho que algunas especies se mantienen isosmóticas con el medio ambiente. Se han efectuado pruebas tapando las glándulas antenales de cangrejos y jaibas y se observó incrementos de peso debido a esta acumulación de fluido glandular. De los experimentos con los decápodos, se puede decir que el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Cl}^-$  frecuentemente tienen que ser absorbidos en contra de una gradiente mientras parte del sulfato y magnesio puede ser debido a fenómenos de difusión. El hecho que las branquias toman parte en la absorción de iones esta claramente deducido de varios experimentos.

En resumen, el mantenimiento de una concentración iónica del plasma sanguíneo diferente a la del medio externo es un fenómeno universal en los crustáceos. Esta regulación iónica es aún encontrada en crustáceos cuya sangre es isosmótica al

medio.

En este grupo las especies con bajo  $Mg^{++}$  son más activas o capaces de movimientos rápidos que aquellas con altos niveles de  $Mg^{++}$ . Los órganos y tejidos principales en la regulación iónica y osmótica son las agallas, las glándulas antenales y, en algunas especies, el estómago. Las agallas son las partes más permeables del integumento y es el sitio de la continua absorción de iones que se pierden en las secreciones de las glándulas antenales de las especies marinas como también la recuperación iónica que sufren las especies de agua dulce por difusión. La absorción involucrada es activa dado a que la mayoría de los iones en el primer caso y todos los iones en el segundo caso son absorbidos en contra de una gradiente de concentración, con la consecuente utilización de energía metabólica.

Las glándulas antenales son parte del mecanismo de regulación iónica. Ellas producen una secreción en donde ciertos iones, especialmente  $Mg^{++}$  y sulfatos, son selectivamente excretados, y el resto, incluyendo el  $K^+$ , son conservados. Sólomente en la familia decápoda de agua dulce Asta-

cidae ha sido demostrado que la secreción de las glándulas antenales es marcadamente hiposmótica a su sangre, funcionando de esta manera como regulador osmótico. En todo el resto de los decápodos, incluyendo los Potamonidae que son exclusivamente de agua dulce, las secreciones antenales son isosmóticas con la sangre.

El funcionamiento del estómago como regulador ha sido probado para Artemia sp. la cual continuamente ingesta el medio. En el resto de los decápodos algunos ensayos no demuestran una clara participación del estómago.

## CAPITULO V

### RECOLECCION DE DATOS

#### 5.1 Mediciones de la Osmolaridad de la Hemolinfa a Diferentes Salinidades

En el apéndice se encuentra las tablas con los datos recolectados durante la presente investigación. Se puede observar un claro comportamiento tendiente a mantener la osmolaridad hemolinfática relativamente constante. El P.vannamei es un hipo-hiperosmoregulador. El punto isosmótico pertenece a ambientes de 25.9 ppt de salinidad.

#### 5.2 Mediciones de la Osmolaridad del agua a diferentes salinidades.

Como es lógico, se encontró que existe una relación directa entre la osmolaridad del agua y su salinidad.

La relación encontrada fue la siguiente:

$$\text{OSM DEL AGUA} = \text{SALINIDAD}(\text{ppt}) \times 26.48 + 42.36$$

### 5.3 Relación Matemática entre la Osmolaridad del Agua y la Osmolaridad de la Hemolinfa.

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente. Si asumimos un comportamiento lineal, este obedecerá la siguiente fórmula:

$$\text{OSM HEMOLINFÁTICA} = \text{OSM DEL AGUA} \times 0.123 + 638.11$$

### 5.4 Rangos Hipertónicos de la Hemolinfa

Los datos muestran un claro comportamiento hipertónico en aguas de hasta aproximadamente 25.9 ppt. La osmolaridad hemolinfática fluctuó entre 580-770 mOsm/Kg, en este rango.

### 5.5 Rangos Hipotónicos de la Hemolinfa

El rango de salinidad en que nuestro organismo bajo estudio se comporta como un hiposmoregulador es el de 25.9 ppt en adelante. (Cabe anotar que las pruebas se efectuaron sólo hasta 30 ppt de salinidad.). La osmolaridad hemolinfática varió de aproximadamente 700-786 mOsm/Kg en este rango.

## 5.6 Rangos de Iso-osmocidad

El rango de isosmocidad estaría dado por los puntos alrededor de los 25.9 ppt de salinidad del agua. Este dato es uno de los objetivos principales de esta investigación.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El consumo de oxígeno y los procesos de absorción y retención de iones en aguas de 0 ppt serán más intensos y por ende requerirán una mayor demanda energética. Aunque por otro lado Eriocheir sinensis tiene el mismo consumo de oxígeno en agua de mar, agua salobre y agua dulce. Esto sólo demuestra que el consumo de oxígeno en el stress osmótico no es una clave precisa y segura para analizar las habilidades de los organismos, aunque si es una pauta fisiológica.

La naturaleza es demasiado sabia para otorgar energía a procesos innecesarios. El P.vannamei es una comprobada especie eurihalina homoiosmótica con la capacidad de locomoción suficiente para movilizarse dentro de las masas de agua que su organismo requiera para una variedad de procesos fisiológicos aún no decifrados por los científicos. Por



esas lagunas en los campos del conocimiento, no se podría afirmar que el P. vannamei siempre buscará las aguas isotónicas a sus fluidos internos, pues sólo estaríamos considerando la osmoregulación, uno de los cientos de fenómenos fisiológicos en desarrollo. Sería temerariamente prematuro, si pretendemos una investigación seria y conciente, concluir este trabajo con leyes fisiológicas.

Sin caer en el error de afirmar, los datos obtenidos en la presente investigación muestran una tendencia a mantener una concentración interna constante. Si el camarón no necesitara de dichas concentraciones, la evolución de millones de años ya hubieran hecho de los penaeidos un género poikilosmótico.

El ploteo de los datos también nos pueden estar simplemente confirmando el comportamiento migratorio de la especie, Nindicándonos que en el rango de peso muestreado el camarón buscará o debería de estar en salinidades de aproximadamente 25.9 ppt para mantener un estado de equilibrio con el ambiente. Se podría especular que especímenes mayores tendrán un rango isotónico mayor y que especímenes menores (post-larvas y juveniles) tendrán un punto isotónico menor. Los primeros estadios larvarios podrían ser la excepción de esta observación puesto que está comprobada su necesidad de altas salinidades. Pero quizás esta necesidad, mas que

reflejar una necesidad iónica, puede ser el resultado de que los mecanismos fisiológicos de osmoregulación aún no se encuentran desarrollados.

El punto isosmótico nos podría dar la pauta del medio en que existe menor consumo de oxígeno como sucede con Ocy-podes quadrata y Palaeomonetes varians. Este punto de mínimo consumo podría ser el ideal para sistemas de transporte en donde el oxígeno y la actividad metabólica juegan un papel importantísimo.

Los rangos de osmolaridad de la hemolinfa van desde 580-740 mOs/Kg en aguas de baja salinidad (aprox 0 ppt) hasta 757-786 mOsm/Kg en aguas de mayor salinidad (aprox 30 ppt). Hay una ligera pendiente ascendente que no haría al camarón puramente homoiosmótico. Esta ligera ascendencia debe ser el resultado de una mayor concentración de partículas en su hemolinfa. En un camarón vivo (se hace esta aclaración puesto a que en las muestras utilizadas para la medición se deja coagular las proteínas) estas partículas podrían ser iones o proteínas que aunque ambas juegan un papel importante en la determinación de la osmolaridad, las partículas iónicas serán las más adecuadas para que algún proceso regulatorio las desplace según su conveniencia fisiológica. Es lógico pensar que es más fácil desplazar iones que engendrar y catalizar sustancias protéicas; además que investigaciones de varios fisiólogos han demostrado que no

es posible que el efecto Donnan producido por las proteínas sean la causa de las diferencias iónicas entre la sangre y el medio ambiente.

De los iones regulables, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  son los que se encuentran en mayores proporciones dentro de los fluidos sanguíneos, además de ser los más incidentes en la determinación de la salinidad externa. Los datos obtenidos de estos dos iones muestran un comportamiento regulatorio similar al de la regulación osmótica total. Se podría efectivamente pensar que estos iones son los determinantes de la osmolaridad hemolinfática.

Al comparar el comportamiento ascendente del  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$ , observamos que el  $\text{Na}^+$  mantiene un nivel más estable (menor pendiente) que el  $\text{Cl}^-$ . Esto puede estar reflejando un requerimiento iónico, una necesidad fisiológica determinada de iones  $\text{Na}^+$ . Ya se sabe de investigaciones de Castille y Lawrence (1981) que aunque no haya una regulación osmótica a través de la orina para el *P. setiferus* y el *P. styliros-*  
*tris*, sí existe una regulación iónica con respecto al  $\text{Na}^+$ . Otra vez sobresale el  $\text{Na}^+$  como ión relevante en los procesos en cuestión. Una razón de mantener los niveles de  $\text{Na}^+$  constantes podría ser la necesidad de obtener un nivel específico de  $\text{K}^+$  intracelular ya que cualquier variación del  $\text{Na}^+$  desencadenaría una respuesta fisiológica por parte

de la Bomba de Na-K celular. Cabe recalcar que sólo estamos analizando los efectos secundarios que podría generar la inestabilidad iónica del Na<sup>+</sup>, condición fisiológica que nuestro organismo en estudio se resiste a tener.

Pero el hecho de que sólo el ión Cl<sup>-</sup> (y no el Na) parece estar regulando y determinando los cambios graduales de la osmolaridad total, lo podría convertir en el principal ión regulador para el mantenimiento de los volúmenes celulares. Además, en salinidades mayores, el Cl<sup>-</sup> hemolinfático tiende a ser más concentrado que el Na<sup>+</sup>, confirmando la necesidad de mantener una concentración estable de Na<sup>+</sup> y el papel del Cl<sup>-</sup> como regulador principal.

Observando la hipertonicidad satisfactoria que mantiene el camarón nos preguntamos cuál será el mecanismo principal de regulación que mantiene estos niveles hipertónicos. Será de absorción iónica del medio externo o de retención iónica de los fluidos que abandonan el cuerpo. Por los estudios hechos con la orina sabemos que no existe mayor retención iónica por parte de las glándulas antenales. Es lógico pensar que la absorción iónica a través de las membranas permeables del cuerpo tendría que ser el mecanismo idóneo teniendo subdesarrollados los mecanismos de excreción iónica. El desplazamiento o resultado neto será la absorción de un fluido cuya concentración osmótica es similar al

de la sangre y orina.

Otra explicación para mantener niveles de  $\text{Na}^+$  más altos y constantes que  $\text{Cl}^-$ , podría yacer en la mayor facilidad que los iones positivos entren a medios que contienen proteínas, esteres fosfóricos y ácidos nucleicos los cuales, en un pH fisiológico, tienen una carga neta negativa.

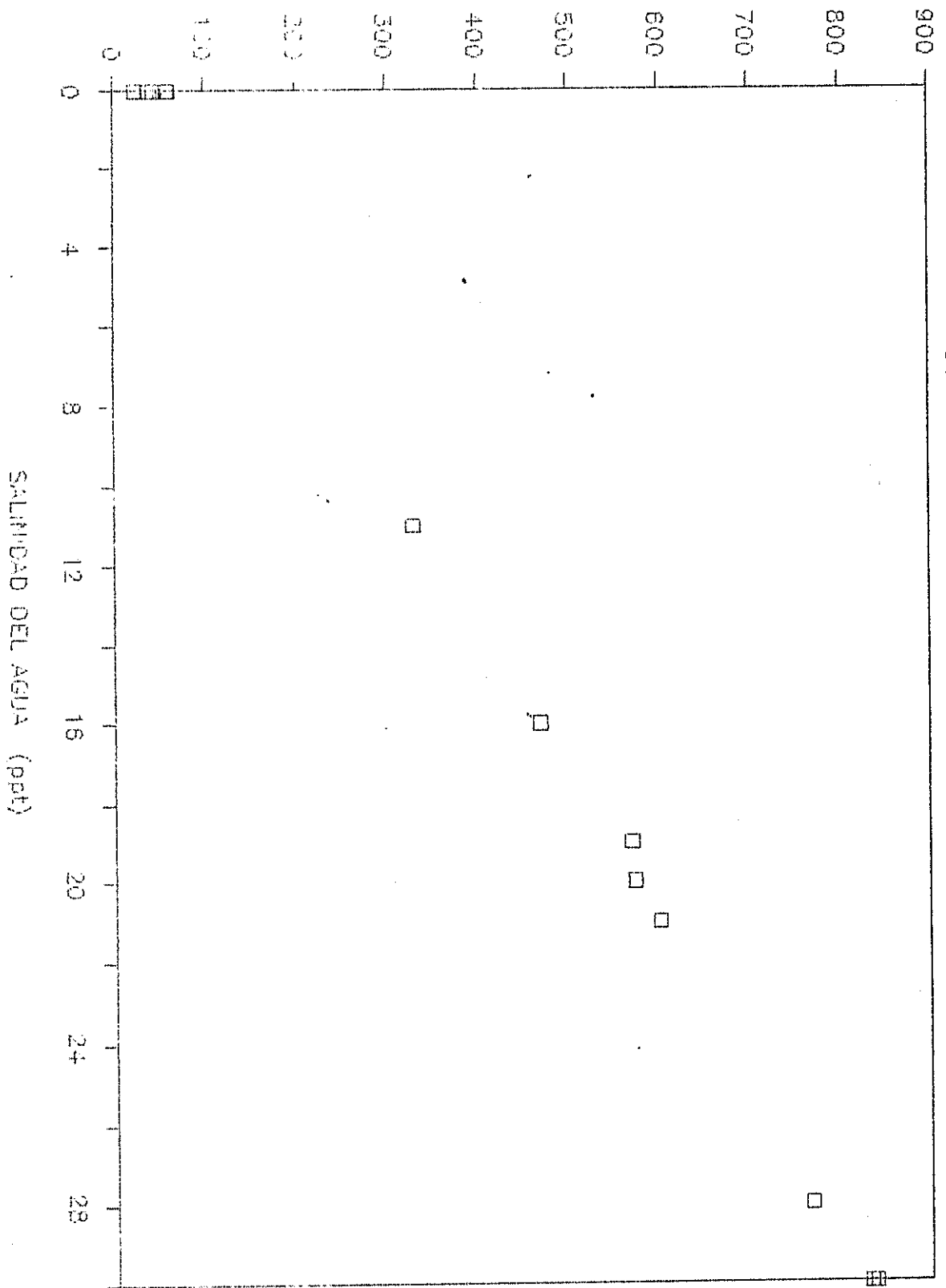
La hipertonicidad relativamente constante que mantiene el P.vannamei podría ser el resultado de la necesidad de mantener un equilibrio osmótico con el agua de mar y que la migración hacia los estuarios sea el efecto de una mayor capacidad reguladora mas no de un cambio de las concentraciones osmóticas e iónicas de su hemolinfa.

Los futuros trabajos de investigación tendrán que aportar en el esclarecimiento de las teorías osmoregulatorias. Habrá que aclarar el efecto del tamaño sobre la osmolaridad interna. Descubrir como manipular las concentraciones iónicas del agua para facilitar al organismo su aclimatación y por ende la supervivencia, es otra de las metas que tendrán los fisiólogos.

El papel e incidencia de otros iones también tendrá que investigarse. Interacciones iónicas más complejas como las que ocurren entre la hemolinfa y el medio intracelular son otro reto.

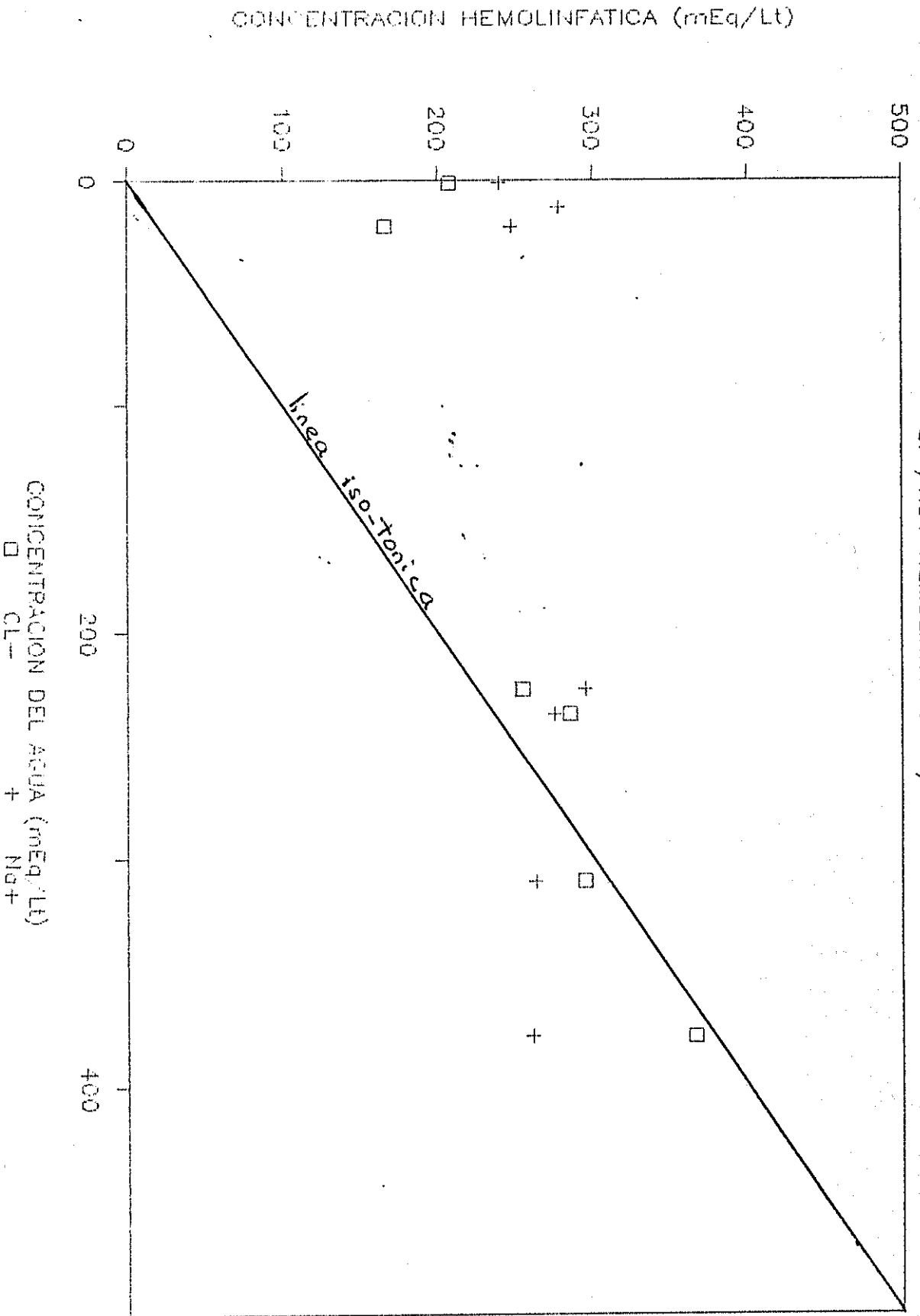
En el Ecuador contamos con una enorme infraestructura productiva que esta obligada y comprometida éticamente a dar apoyo a las investigaciones e instituciones que nacen de ella.

OSMOLARIDAD DEL AGUA (mOsm/Kg)



# grafico #2

Cl<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> + HEMOLINFA vs Cl<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup> DEL AGUA





# GRAFICO #3

OSM DE LA HEMOLINFA VS OSM DEL AGUA

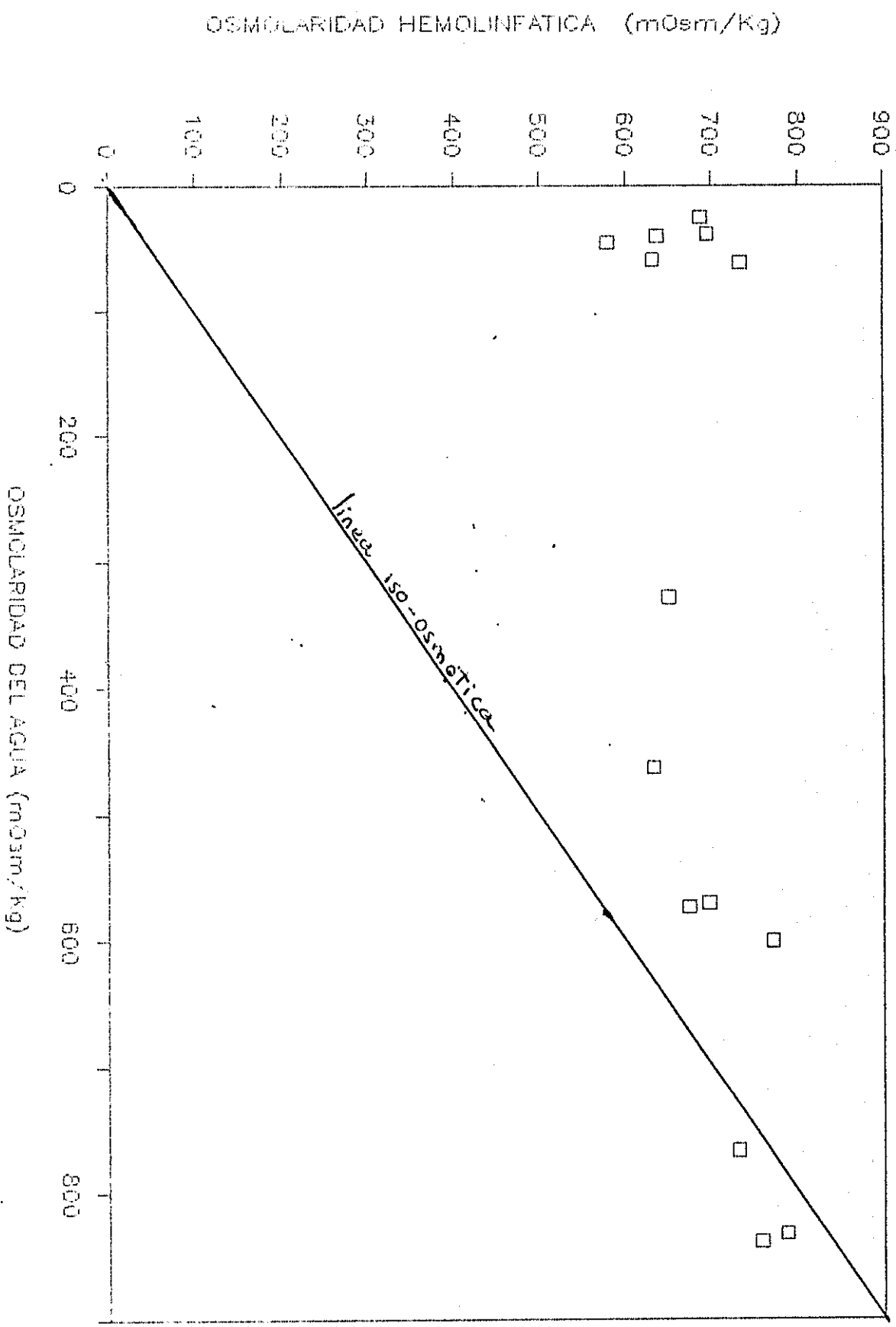


TABLA #1

*SALINIDAD*	*OSMOLAR.*
*DEL AGUA	*DEL AGUA *
0	45
0	40
0	25
0	61
16	469
19	570
20	573
21	600
11	329
26	767
0	38
0	59
30	838
30	832

TABLA #2

*Cl-	*Cl-
*DEL AGUA	*HEMOLINFA*
1	208
20	166
236	285
310	295
225	355
378	366

TABLA #3

*Na+	*Na+
*DEL AGUA	*HEMOLINFA*
11,5	240
21	248
26	275
200	263
291	295
121	261
288	278

TABLA #4

*OSMOLAR.	*OSMOLAR.
*DEL AGUA	*HEMOLINFA*
45	580
40	637
25	687
61	733
463	632
570	696
573	673
600	770
329	650
767	730
38	695
59	632
838	757
832	786
220	650
158	625
716	724
470	670
470	710
331	680
331	664

Figura 1.- Lugar de extracción de la Hemolinfa

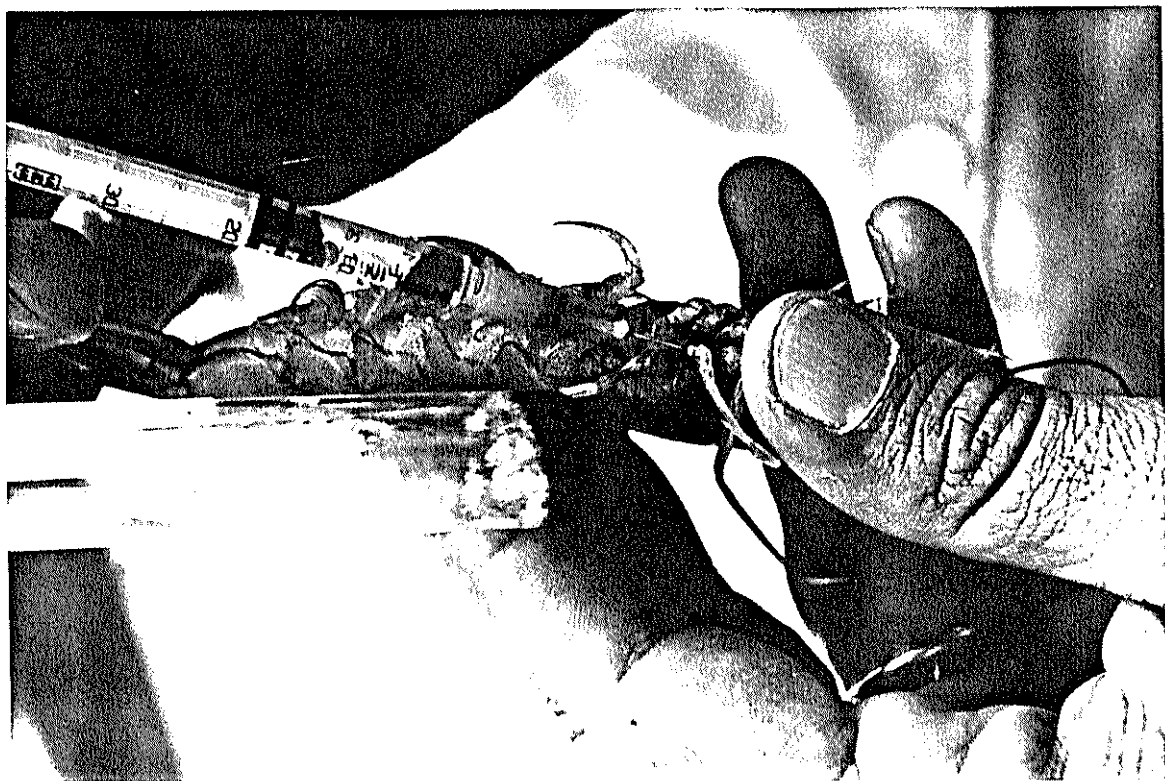


Figura 2.- Osmómetro

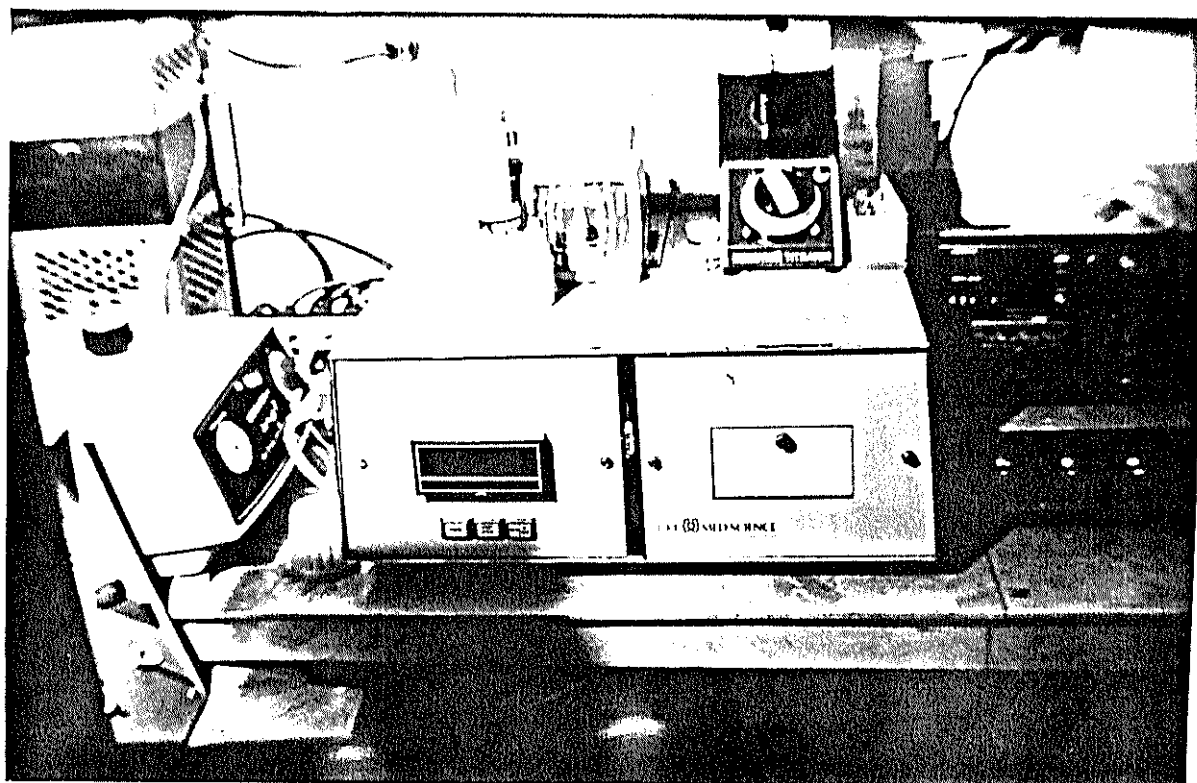


Figura 3.- Fotómetro de Llama

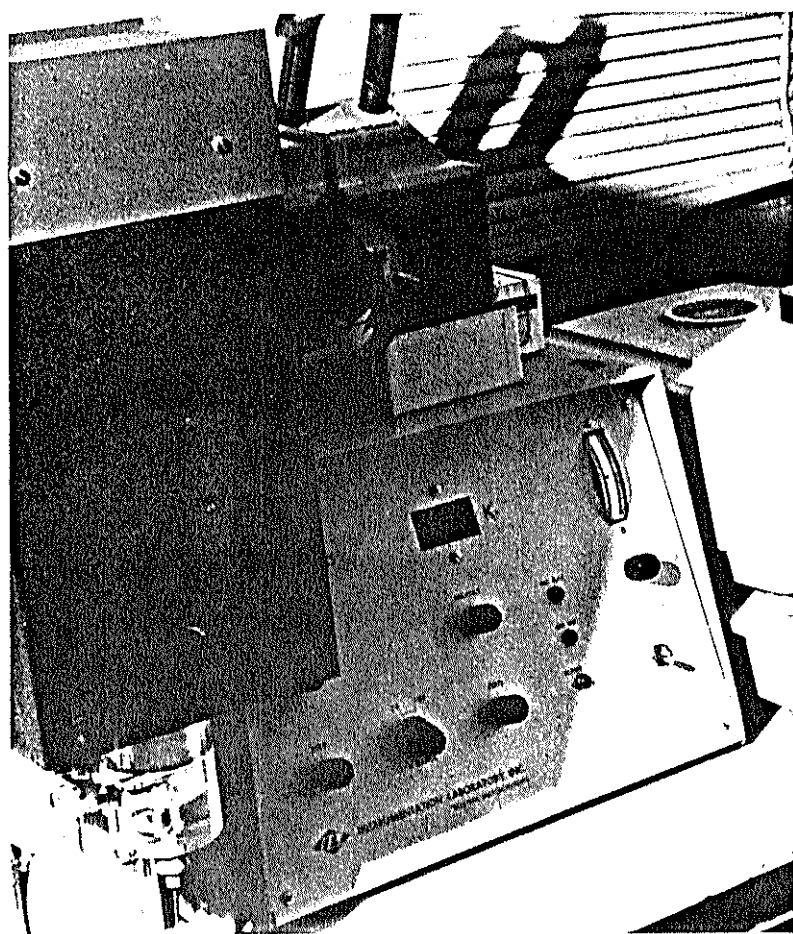
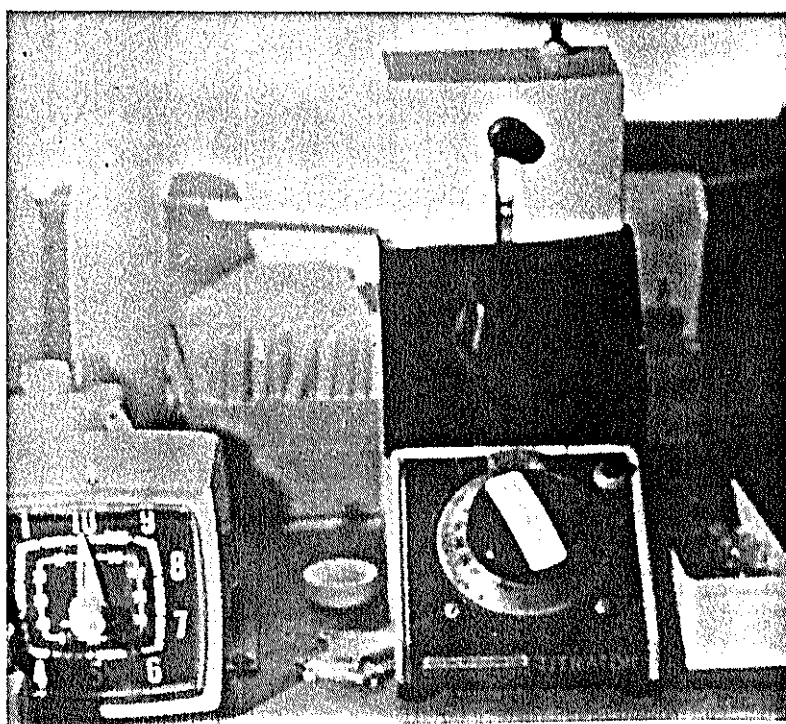


Figura 4.- Titulador



## BIBLIOGRAFIA

1. Balacs, Oldrich y Tumbleson. 1982. SERUM CONSTITUENTS OF THE MALAYSIAN PRAWN MACROBRACHIUM ROSENBERGII AND THE PINK SHRIMP PENAEUS MERGUIENSIS
2. Castille y Lawrence. 1981. A COMPARISON OF THE OSMOTIC, SODIUM AND CHLORIDE CONCENTRATIONS BETWEEN THE URINE AND HEMOLYMPH OF PENAEUS SETIFERUS AND PENAEUS STYLIROSTRIS.
3. Castille y Lawrence. 1981. THE EFFECT OF SALINITY ON THE OSMOTIC, SODIUM AND CHLORIDE CONCENTRATIONS IN THE HEMOLYMPH OF THE ROCK SHRIMPS SICYONIA BREVIROSTRIS AND S.DORSALIS
4. Castille y Lawrence. 1981. A COMPARISON OF THE CAPABILITIES OF JUVINILE AND ADULT P.SETIFERUS AND P.STYLIROSTRIS TO REGULATE THE OSMOTIC, SODIUM AND CHLORIDE CONCENTRATIONS IN THE HEMOLYMPH.

5. Dole y Bayer. 1977. A REFRACTOMETER METHOD OF DETERMINING SERUM PROTEIN IN THE AMERICAN LOBSTER. *Aquaculture* 12(1977) 169- 171.
6. Gilles y Pequex. 1983. INTERACTION OF CHEMICAL AND OSMOTIC REGULATION WITH THE ENVIRONMENT. *Biology of Crustacea Vol.3 Academic Press.*
7. Gannon. PRINCIPIOS DE FISILOGIA.
8. Guyton, A.L. 1984. TRATADO DE FISILOGIA MEDICA.
9. Harrison and Lutz. STUDIES OF THE ONTOGENESIS OF OSMOREGULATION IN MACROBRACHIUM ROSENBERGGII WITH APPLICATION FOR SHIPPING LARVAE.
10. Hedgepeth. 1971. TREATISE ON MARINE ECOLOGY AND PALEOECOLOGY. Vol 11
11. Jackson, A.J. 1981. OSMOTIC REGULATION IN RAINBOW TROUT FOLLOWING TRANSFER TO SEA WATER.
12. Lockwood, A.P.M. ASPECTS OF THE PHYSIOLOGY OF CRUSTACEA.
13. OEA. 1980. TRANSPORTE A TRAVES DE LA MEMBRANA CELULAR.
14. Panikkar. PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF ADAPTATION TO ESTUARINE CONDITIONS
15. Panikkar. OSMOTIC BEHAVIOUR OF SHRIMPS AND PRAWNS IN RELATION TO THEIR BIOLOGY AND CULTURE.

16. Robertson;Bray;Leung-Trujillo y Lawrence. 1987. PRACTICAL MOLT STAGING OF PENAEUS SETIFERUS AND P.STYLIROSTRIS
17. Sandifer, Hopkins y Smith. 1975. OBSERVATIONS ON SALINITY TOLERANCE AND OSMOREGULATION IN LABORATORY REARED MACROBRACHIUM ROSENBERGII POST-LARVAE
18. Singh. 1980. THE ISOSMOTIC CONCEPT IN RELATION TO THE AQUACULTURE OF THE GIANT PRAWN MACROBRACHIUM ROSENBERGII
19. Talbot y Watermann. 1960. THE PHYSIOLOGY OF CRUSTACEA. VOL I
20. Valentine, J.W. EVOLUTIONARY PALEOECOLOGY OF THE MARINE BIOSPHERE