

# Licenciatura en Manejo Sustentable de Zonas Costeras

Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación  
Facultad de Ciencias,  
UNAM

## Prácticas de Ecofisiología



Carlos Rosas, Honorio Cruz, Ariadna Sánchez y Vianney E. Sosa,  
Cristina Pascual

Octubre 2008



# Práctica 1.

## Curva de tolerancia a la salinidad en camarón (*Litopenaeus vannamei*)

### I. Introducción

La salinidad es uno de los factores del medio más importante para los organismos que habitan la zona costera, pues con frecuencia en esa zona los organismos están expuestos a los cambios de salinidad provocados por la marea, las lluvias y la descarga de los ríos.

Algunas especies marinas como los camarones, son un ejemplo de organismos expuestos a cambios de salinidad dado que habitan en la zona costera, en donde se distribuyen en las zonas inundadas de la costa, estando así expuestos a aguas salobres, marinas, e incluso, **hipersalinas**. Estos organismos tienen un ciclo de vida con fases estuarina y marina. Las fases larvianas habitan aguas oceánicas en donde se desarrollan hasta transformarse en postlarvas; siendo postlarvas, se orientan hacia los estuarios y las lagunas costeras en donde se reclutan como juveniles tempranos. En estos sitios, donde la salinidad es altamente variable, algunas especies de camarones tienen la capacidad de colonizar ambientes más diluidos que otras. En un estudio llevados a cabo con tres especies de camarones peneidos, *L. stylirostris*, *F. californiensis*, y *L. vannamei* (Mair, 1980), se observó que *L. vannamei* es la que mejor tolera los ambientes diluidos. En este mismo estudio, juveniles tempranos de *L. vannamei* colocados en un gradiente experimental de salinidad, prefirieron salinidades entre 3 y 6, en comparación a los 32-35 o 9-26 que prefirieron *L. stylirostris* y *F. californiensis*, respectivamente. A través de una curva de tolerancia, como su nombre lo indica, se pueden definir los intervalos de un factor ambiental, en este caso salinidad, dentro de los cuales los organismos desempeñan sus funciones biológicas que garantizan la perpetuación de la especie (Zona de tolerancia de compatibilidad o biocinética), y aquellos en donde los mecanismos fisiológicos son puestos en marcha para resistir a una condición que afecta el desempeño biológico general (Zona de resistencia o letal), llegando incluso a ocasionar la muerte de los organismos (Fig. 1) (Vernberg, 1983; Prosser, 1991).

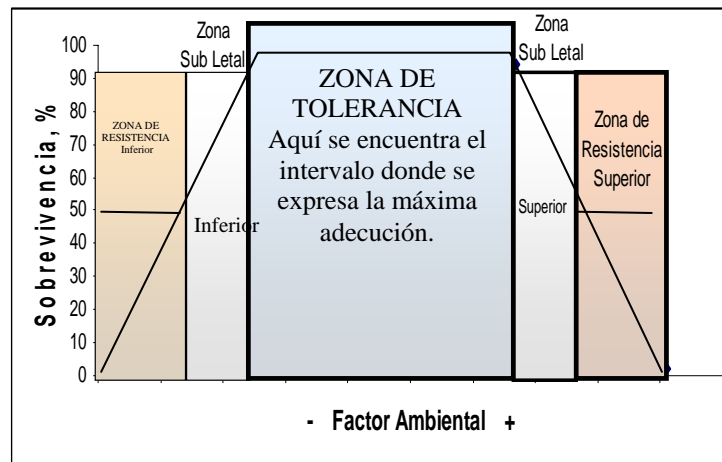


Fig. 1. Curva de tolerancia a los cambios de un factor ambiental.

En la zona de tolerancia existen dos sub zonas: una de máxima adecuación y otras dos de resistencia (ZR), definidas por líneas punteadas. La zona de máxima de adecuación para la mayoría de las especies se ubica a la derecha en la zona de tolerancia. El estadio del ciclo de vida y la combinación con otros factores ambientales son los que determinan la amplitud, y por lo tanto, la posición de la línea en relación al factor ambiental que se está estudiando. En forma general, la zona subletal puede ser establecida cuando se observa una mortalidad mayor o igual al 10 % en 96 h de haber sido los organismos expuestos al factor ambiental. Por su parte, la zona de resistencia comienza cuando la mitad de una población de animales en estudio muere como consecuencia de los efectos del factor ambiental después de 96 h de exposición, es decir, los límites de la zona de tolerancia y resistencia se establecen por el nivel de factor que ocasiona el 50 % de mortalidad en pruebas agudas (96 h).

Es importante considerar que la amplitud de la zona de tolerancia está determinada genéticamente y puede ser modificada por la aclimatación y el tiempo de exposición al factor ambiental.

## II. Objetivo.

Determinar la curva de tolerancia a la salinidad de juveniles de camarón (*L. vannamei*)

## III. Materiales y métodos

### a) Materiales.

1. 7 Tanques de 80 L
2. Bombas de aireación
3. Agua con distintas salinidades: 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60.
4. 140 juveniles de *L. vannamei*
5. Redes de mano de 10 x 10 cm.
6. Equipo: refractómetro de mano, termómetro, potenciómetro

Lugar de procedencia de los camarones: Área de estanques UMDI. Registrar la salinidad, la temperatura y el pH en el momento de la captura.

### b) Métodos.

Se acondicionarán 7 tanques con aireación y agua con una de las siguientes salinidades: 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60. En cada tanque se colocarán 20 camarones, por lo que se requiere capturar al menos 200 juveniles de *L. vannamei* para asegurar los 140 camarones que se requieren para la práctica. Se tomarán los parámetros fisicoquímicos de esta agua: salinidad, temperatura y pH.

Al terminar de preparar los tanques experimentales con las diferentes salinidades, se debe verificar la salinidad, y la temperatura y pH. La temperatura es el parámetro que debe permanecer igual para todos. Se colocarán los 20 camarones en cada uno de los tanques preparados y se anotará la hora en que se colocan.

Durante las 96 horas los animales que dura el experimento los camarones no serán alimentados. Todos los días se realizarán recambios de agua en proporción al 50 % del

volumen total. Para hacer esto es necesario prever el tener agua de mar preparada a cada salinidad en el volumen suficiente para hacer estos recambios. Se cuantificará el número de animales muertos a las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas.

**IV. Resultados.**

- a. Elabore una tabla en la cual se registre el número de organismos muertos a lo largo del ensayo. Siga el ejemplo de la tabla 1.

Tabla 1.

Horas	Fecha	T°C	pH	Tanques							Observaciones
				1	2	3	4	5	6	7	
				0	10	20	30	40	50	60	
0											
1											
2											
4											
6											
8											
12											
24											
36											
48											
72											
96											

- b. Calcule la sobrevivencia considerando el número de organismos iniciales como 100 %, y grafique la sobrevivencia acumulada con respecto al tiempo
- c. Grafique la sobrevivencia registrada al final del experimento (Eje Y) contra la salinidad (Eje X)
- d. Localice el valor que corresponda con la salinidad que produjo una sobrevivencia cercana al 50 % de los organismos a partir de una estimación de la curva experimental obtenida (Fig. 2).
- e. Localice la zona de tolerancia, con los limites de la zona de resistencia a la salinidad, la inferior y la superior.

**V. Análisis y Discusión**

Elabore un informe discutiendo los resultados obtenidos tomando en cuenta los aspectos particulares del ciclo de vida del género *Litopenaeus spp* en relación a la curva de tolerancia obtenida.

Literatura Recomendada

Brito, R., Chimal, and Rosas C. 2000. Effect of salinity in survival, growth and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda; penaeidae). *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 244: 253-263..

Chen, J.C., Lin, M.-N., Lin, J.Y., Ting, Y.-Y. 1992. Effect of salinity on growth of *Penaeus chinensis* Juveniles. *Comparative Biochemistry Physiology*. 102A: 343-346.

- Decamp, O., Cody, J., Conquest, L., Delanoy, G., Tacon, A. 2003. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquaculture Research* 34: 345-355.
- Mair, J.M. 1980. Salinity and water type preferences of four species of postlarval shrimp (*Penaeus*) from Wets México. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 45: 69-82.
- McGraw, W.J., Davies, D.A., Teichert-Coddington, D.R., Rouse, D.B. 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint and rate of salinity reduction. *Journal of the World Aquaculture Society* 33: 78-84.
- Ogle, J.T., Beaugez, K., Lotz, J.M. 1992. Effects of salinity on survival and growth of postlarval *Litopenaeus vannamei*. *Gulf Research Reports* 8: 415-421.
- Ponce-Palafox, J., Martínez-Palacios, C.A., Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juveniles white shrimp *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157: 107-115
- Prosser, L. (edit) 1991. Environmental and Metabolic Animal Physiology. 4a. edición. Wiley-Liss Inc. Pub. New York, U.S.A. 578 pp.
- Rosas, C., Ocampo, L., Gaxiola, G., Sánchez, A., Soto, L.A. 1999. Effect of salinity on survival, growth and oxygen consumption of postlarvae (PL10-PL21) of *Penaeus setiferus*. *Journal of Crustacean Biology* 19: 67-75.
- Rosas, C., López, N., Mercado, P., Martínez, E. 2001. Effect of salinity acclimation on oxygen consumption of white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal Crustacean Biology* 21: 279-292.
- Staples, D.J., Heales, D.S. 1991. Temperature and salinity optima for growth and survival of juveniles banana prawns *Penaeus merguensis*. *Journal Experimental Marine Biology. Ecology*. 154: 251-274.
- Vernberg F.J. (Ed) 1975. Physiological adaptation to the environment: Proceedings of a symposium held at the 1973 meeting of the American institute of Biological Sciences. Intext Educational Publishers. New York, U.S.A. 650 pp.

## Glosario

**Gradiente.-** Aumento o disminución gradual de un parámetro en un determinado tiempo

**Larva.-** Primera etapa del desarrollo metamórfico de crustáceos decápodos.

**pH.-** Concentración de hidrogeniones que determinana la medida de la acidez/alcalinidad que va de ácido (pH 1) a alcalino (pH 14) medido en escala logarítmica.

**Postlarva.-** Estadio del ciclo biológico de crustáceos decápodos, alcanzado después de haber pasar por los diferentes estadios larvales.

**Refractómetro.-** Instrumento óptico que se utiliza para conocer el contenido de sales de una solución.

**Salinidad.-** Contenido de sales disueltas en suelos o agua.

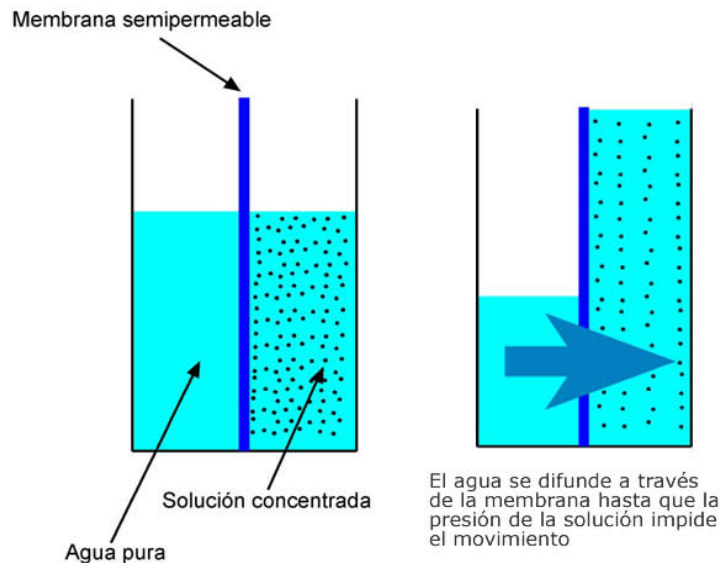
**Salobre.-** Intermedio entre el agua dulce y salina

**Zona de resistencia o letal.-** Zona límite de la curva de tolerancias donde el organismo despliega mecanismos fisiológicos y energéticos para poder resistir a una condición que afecta el desempeño biológico general llegando incluso a ocasionar la muerte de los organismos

**Zona de tolerancia o compatibilidad biocinética.-** Zona de la curva de tolerancias donde los organismos desempeñan sus funciones biológicas que garantizan la perpetuación de la especie

## Práctica 2.

### Efecto del cambio de salinidad en la presión osmótica de *L. vannamei*



El paso físico de una solución a través de una membrana semipermeable depende de la concentración de solutos en ambos lados de la membrana. En el ejemplo, el agua pura pasa a través de una membrana semipermeable hacia la solución concentrada, hasta que la presión de la solución hace que se pare el movimiento del paso de los fluidos. A esa presión se le conoce como presión osmótica.

#### I. Introducción.

La salinidad es un factor modulador y enmascarador del estado fisiológico de camarones (Fry, 1947). En los ambientes costeros, como las lagunas costeras donde viven juveniles de camarón de diferentes especies, la salinidad fluctúa con frecuencia por ser una zona expuesta al ciclo de mareas, de cambios estacionales (épocas de secas/lluvias), e influencia de ríos. Para lograr sobrevivir y crecer a su tasa máxima, los camarones se han adaptado poniendo en marcha diversos mecanismos fisiológicos que les han permitido compensar cambios bruscos de la salinidad. Así por ejemplo, una disminución en la salinidad significa una entrada masiva de agua como consecuencia de un proceso de difusión simple. Para evitar una dilución extrema y, por lo tanto, un aumento en el volumen celular, ocurren los siguientes procesos:

1. Reducción de la concentración de los principales iones osmoefectores disueltos en el citoplasma ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ).
2. Transporte de aminoácidos de la célula hacia la sangre, y de ahí, a la glándula digestiva.
3. Cambio en la permeabilidad de las células branquiales.

Durante los ajustes a la salinidad, la entrada y salida de osmolitos (AA y iones) produce cambios en la concentración osmótica de la sangre, por los que los organismos tienen que realizar ajustes para mantener el volumen celular.

La capacidad para realizar los ajustes de la concentración osmótica se puede medir utilizando un osmómetro, el cual mide directamente la cantidad de moléculas osmóticamente activas en un fluido.

De acuerdo al patrón de comportamiento osmótico, en general existen dos tipos de organismos: aquellos que son capaces de mantener la concentración osmótica del medio interno constante dentro de un intervalo amplio de concentraciones osmóticas del medio externo (salinidad), **osmoreguladores**, y aquellos organismos que no pueden mantener la concentración osmótica del medio interno, denominados **osmoconformadores**.

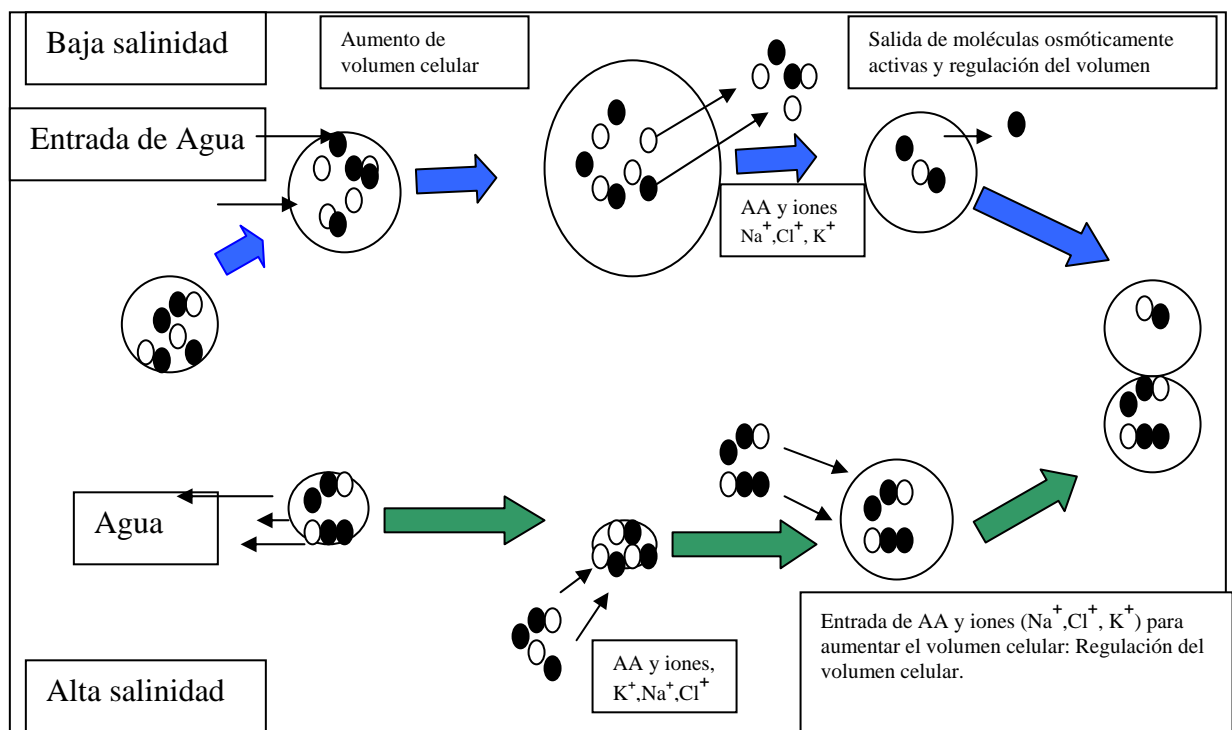


Fig. 1. Mecanismos de regulación del volumen celular en animales acuáticos después de un cambio de salinidad. Las flechas azules muestran un aumento de volumen celular asociado con la entrada de agua cuando el ambiente es diluido. La salida de iones y aminoácidos (AA) funciona como un mecanismo de regulación del volumen. Cuando la salinidad es elevada hay una reducción del volumen celular debido a la salida del agua; en este caso, la entrada de AA y iones a la célula es el mecanismo para la regulación del volumen celular.

## II Objetivo

Conocer los mecanismos de compensación de camarones ante los cambios de la salinidad ambiental a través de los ajustes fisiológicos asociados con el equilibrio hidromineral.



### III. Materiales y métodos.

#### a) Materiales

1. 5 Redes de mano de 10 x 10 cm
2. 10 tanques de 80 L
3. Recipiente con agua de mar (hielera o tara)
4. Contenedor con agua congelada, (para ayudar a disminuir la temperatura)
5. 120 Jeringas hipodérmicas desechables
6. Solución anticoagulante para camarón (SIC-EDTA)
7. Placa congelante
8. Franela y papel desechable
9. 70 cuadros (4 x 4cm) de Papel parafilm
10. Vaso de precipitado de 50 ml con agua destilada
11. Papel secante suave
12. Recipiente con agua de jabón
13. Equipo:
  - Termómetro
  - Refractómetro de mano
  - Microsmómetro (Advanced Instruments) y accesorios (pistón de microsmómetro, puntas para pistón y cotonetes)

#### b) Métodos

1. Se colectarán 200 juveniles de *L. vannamei* del área de estanques externos de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, UNAM, Sisal, Yucatán. La captura debe ser por lo menos 24 h antes de la práctica
2. Los animales se colocarán en dos tanques de 80 L a 34 de salinidad antes de ser expuestos a las salinidades experimentales.
3. Se acondicionarán 8 tanques de 80 L con aireación los cuales estarán sujetos a las condiciones:
  - Tres tanques a los que se les ajustará un cambio brusco de salinidad (0, 30, y 60) y Tres tanques a los que se les ajustará un cambio paulatino de salinidad (0, 30, y 60)
4. De cada tanque se tomarán los parámetros fisicoquímicos: salinidad, temperatura y pH.

Para el caso de los tanques en los que se hará el cambio paulatino, 60 camarones serán colocados en tres grupos de 20 animales por cada tanque y se les harán cambios diarios de salinidad del orden de 10 (Tabla 1).

En el caso de los tanques del cambio brusco también se colocarán 20 camarones por tanque y ahí se mantendrán por 72 horas hasta el día del muestreo.

Los animales serán muestreados al mismo tiempo, es decir, cuando los animales expuestos al cambio paulatino lleguen a la salinidad de 60, los animales de cambio brusco serán expuestos a la nueva salinidad. Un día después todos los animales serán muestreados.

**Tabla 1.**

SALINIDAD (0,30,60)			
Tratamiento	0	30	60
BRUSCO	n = 20	n = 20	n = 20
PAULATINO	10 por día		
	n = 20	n = 20	n = 20

Al terminar de preparar los tanques experimentales con las diferentes salinidades, se debe verificar la salinidad, y la temperatura y pH. La temperatura es el parámetro que debe permanecer igual para todos.

Se colocarán los 20 camarones en cada uno de los tanques preparados y se anotará la hora en que se colocan.

Durante 72 horas los animales que dura el experimento los camarones no serán alimentados. Todos los días se realizarán recambios de agua en proporción al 50 % del volumen total. Para hacer esto es necesario prever el tener agua de mar preparada a cada salinidad en el volumen suficiente para hacer estos recambios.

Se cuantificará el número de animales muertos.

## **Muestreo.**

### **1. Manejo de los organismos.**

El manejo de los animales antes de la toma de muestras de hemolinfa es un aspecto crucial en este tipo de análisis. La manipulación en sí misma puede alterar de manera significativa los componentes sanguíneos, por lo que antes del muestreo de extracción de la sangre (hemolinfa), los camarones se deben introducir en un baño frío (5 °C por debajo de la temperatura inicial) para disminuir su metabolismo.

Prepare el recipiente (hielera o tara) en donde van a ser transportados los organismos al laboratorio: llene el recipiente a la mitad con agua en la que han sido mantenidos los camarones, y tome la temperatura. Posteriormente introduzca un contenedor con agua congelada manteniéndolo hasta que la temperatura haya disminuido 5 °C por debajo del registro inicial. En todo momento debe de evitarse una manipulación excesiva de los camarones. Es importante considerar el volumen del recipiente donde van a transportarse los animales al laboratorio porque la densidad genera disminución de oxígeno, y por lo tanto, estrés.

### **2. Obtención de Hemolinfa.**

Una vez que los animales han sido acondicionados a la baja temperatura y la luz ambiental del laboratorio (cinco minutos), es posible tomar las muestras de sangre. Al momento de sacar al animal del recipiente (hielera o tara), es necesario secarlo perfectamente para evitar un posible contacto entre la hemolinfa y el agua.

Para extraer la sangre se utilizará una jeringa desechable hipodérmica la cual contiene 100  $\mu\text{L}$  de solución anticoagulante (SIC-EDTA, Vargas-Albores *et al.*, 1993). Justo antes de la extracción de sangre, la solución anticoagulante debe descartarse completamente. La hemolinfa se extrae del seno ventrolateral del abdomen del camarón con ayuda de la jeringa. La aguja se inserta suavemente a través de la membrana articular de la quinta pata, para tener acceso al seno. Lentamente se desliza la aguja y, al mismo tiempo, se retira suavemente el émbolo de la jeringa, de tal forma que al momento en que la aguja entre en contacto con la sangre ésta pueda fluir hacia la jeringa (fig. 1).



Fig. 1. Toma de hemolinfa del camarón

### 3. Evaluación de la Presión Osmótica

La hemolinfa extraída se pone sobre el papel parafilm, el cual, a su vez, está sobre una placa congelante. Con el pistón del microosmómetro se toma la muestra de hemolinfa (fig. 2), se retira el excedente con papel secante, y se introduce en el microosmómetro (fig. 3) hasta sentir que el pistón llega al tope. Se pulsa el botón "start" (inicio). Después de aproximadamente 1 minuto se va a escuchar dos sonidos fuertes (tipo matraca) y poco después la pantalla muestra una lectura expresada en  $\text{mMol/kg}$ . Anotar la lectura.



Fig. 2. Toma de la hemolinfa de la placa congelante



Fig. 3. Lectura en microosmómetro: pistón introducido en microosmómetro

Sacar el pistón y apretar fuertemente el émbolo para quitar el capuchón y se desecha en el recipiente que contiene agua y jabón. Se enjuaga el émbolo en el vaso de precipitado con agua destilada y se seca con el papel secante. Se pone un nuevo capuchón y está listo el émbolo para una nueva toma de muestra. Se introduce el cotonete en el microosmómetro y se gira cuidadosamente para limpiar el equipo. Para cada lectura es importante limpiar el equipo y dejar el cotonete puesto antes de introducir de nuevo el émbolo.

Al terminar de evaluar las muestras de sangre de camarón, es necesario hacer dos lecturas por cada muestra de agua de la condición experimental en la que los organismos estuvieron mantenidos. Anotar las lecturas.

#### IV Resultados

1. A partir de los datos obtenidos (Presión Osmótica, -PO-), calcular la Capacidad osmótica (CO), donde CO es:

$CO = PO \text{ de hemolinfa} - PO \text{ del agua del medio donde se mantuvo al organismo.}$

#### Ejemplo:

Se tiene un valor de PO de hemolinfa de 850 mOsm/kg y del agua 950 mOsm/kg, entonces:

$$CO = (850 - 950) = -100$$

2. Graficar la PO de los organismos mOsm/kg (eje Y), contra la salinidad PO del medio externo (eje X).

#### V. Análisis y Discusión de los datos.

A Definir el grupo de organismos al que pertenecen los camarones: osmoconformadores u osmorreguladores con respecto a las tres salinidades.

B Discutir los resultados obtenidos tomando en cuenta la relación entre la capacidad osmótica de los camarones del género *Litopenaeus*, con el hábitat de la especie y su biología.

#### Literatura Recomendada

Charmantier, G., Soyés, C., Aquacop, 1994. Effect of moult stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Ecol.* 178: 223-246.

Charmantier, G., 1998. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in two decapod crustaceans. *Biol. Bull.* 175: 102-110.

Chen, J.C., Chen, C.T., 1996. Changes of osmotic and electrolyte concentrations in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C(1): 35-38.

- Chen, J.C., Lin, J.L., 1994. Responses of osmotic and chloride concentrations of *Penaeus chinensis* Osbeck subadults acclimated to different salinity and temperature levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 179(2): 267-278.
- Fry, F.E.J., 1947. Effect of the environment on animal activity. University of Toronto Studies. Biol. Series, No. 55, 62 pp.
- Lin, S.-J., Ting, Y.-Y., 1994. Effects of mercury on the growth, hepato-somatic index, water content in muscle and osmotic and protein concentrations in the hemolymph of *Penaeus penicillatus*. *J. Taiwan Fish. Res.* 3(1): 41-51.
- Pequeux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15(1):1-60.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Van Wormhoudt, A., 2001. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae). *Aquac Research* 32, 1-20.
- Rosas, C., Martínez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A., Soto, L.A., 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234(1): 41-57.
- Vargas Albores, F., Guzmán, M.A. y Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for hemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem Physiol*, 106A: 299-303
- Yencey, P. 2001. Water stress, osmolytes and proteins. *Amer. Zool.* 41:699-709

## Glosario

**Aminoácidos (AA).**-; Compuesto orgánico contiene al menos un grupo carboxilo y un grupo amino; son las unidades estructurales de las proteínas.

**Aclimatación.**- cambio persistente en una función específica debido a una prolongada exposición a una condición ambiental.

**Citoplasma.**- Sustancia semifluida que llena el interior de la célula e excepción del núcleo y que incluye en su seno otros organelos.

**Equilibrio hidromineral.** Proceso de mantenimiento de líquidos corporales.

**Glándula digestiva.**- Órgano que secretan y/o excretan sustancias que intervienen en el proceso digestivo

**Hemolinfa:** Líquido circulatorio de los artrópodos, moluscos, etc. análogo a la sangre de los vertebrados.

**Hemocianina:** Proteína presente en la sangre de los artrópodos, moluscos, etc. Se encarga del transporte de oxígeno, presenta dos átomos de cobre en su centro activo.

**Iones.-** Es un átomo o grupo de átomos con una carga eléctrica.

**Membrana articular.-** Membrana que une secciones del esqueleto cuticular de los apéndices en los artrópodos

**Osmol.-** Unidad estándar de presión osmótica

**Osmoconformador:** Organismo que exhibe una osmoregulación muy pequeña o carece de ella de manera que la osmolaridad de sus líquidos corporales sigue las alteraciones en la osmolaridad del medio ambiente.

**Osmoefectores.- Iones que intervienen en el proceso osmótico.**

**Osmolito.-** Sustancia usada por el organismo con el propósito de elevar la presión osmótica o bajar el punto de congelación de un líquido corporal.

**Osmoregulador.-** Organismo que controla su osmolaridad interna frente a los cambios de osmolaridad ambiental

**Ósmosis.-** Movimiento de solvente puro desde una solución de menor concentración de soluto a otra más concentrada a través de una membrana semipermeable que separa ambas soluciones

**Presión osmótica:** La cantidad de presión requerida para impedir el flujo osmótico a través de una membrana semipermeable que separa dos soluciones con diferentes concentraciones de soluto. El osmol es la unidad de medida, y equivale a la de un mol disuelto en un litro de agua, a una presión de 22.4 atm y a 0 °C de temperatura.

**Seno ventrolateral.-** Espacio tisular que forma parte del sistema circulatorio arterial en los crustáceos y que se localiza en la parte ventral del cefalotórax del camarón; la sangre pasa a través del seno y llega a los tejidos y las superficies respiratorias.

**SIC-EDTA.-** Solución isotónica para camarones, con una sal (EDTA), que funciona como anticoagulante.

# Práctica 3

## Efecto de la frecuencia de alimentación sobre la respuesta fisiológica de *Litopenaeus vannamei*

### I. Introducción

El alimento es uno de los factores bióticos del medio indispensable para el crecimiento y reproducción de los organismos debido al aporte de energía y nutrientes que éste proporciona. El flujo de energía en el organismo, a partir del alimento ingerido, da cuenta de la proporción que se absorbe, asimila y utiliza para el crecimiento.

El flujo de materia y energía que mantiene un estado fisiológico integral ocurre de manera simultánea e incesante a partir de los nutrimentos (lípidos, carbohidratos y proteínas) aportados en el alimento. La energía química contenida en ellos se transforma en gradientes eléctricos, iónicos, osmóticos y de concentración muscular, etc., indispensable para producir trabajo y mantener la integridad estructural, para que los organismos se mantengan, crezcan, y se reproduzcan (Hill 1979).

Por lo tanto, un organismo vivo requiere un aporte frecuente de alimento por el gasto continuo de energía necesaria para mantener su función y estructura de todos los niveles de organización. Si el suministro energético disminuye por debajo de la cantidad requerida para su mantenimiento, el organismo consumirá sus propias reservas energéticas, y al agotarlas, el organismo morirá inevitablemente (Eckert *et al* 1989). Entonces, en cualquier organismo la deposición, movilización y utilización de los nutrimentos es indispensable como parte del mantenimiento de la homeocinesis. Por esto, las concentraciones de diferentes nutrimentos (carbohidratos, lípidos y proteínas) en la hemolinfa, han sido utilizadas como indicadores de mecanismos de regulación cuando los organismos se exponen a varias condiciones (Ferraris *et al* 1986; Vinagre y Da Silva, 1992; Santos y Keller, 1993; Webster, 1996; Hall y van Ham, 1998; Racotta y Palacios, 1998; Rosas *et al* 2001a; Rosas *et al*, 2001b; Sánchez *et al* 2001; Pascual *et al*. 2006).

La sangre de los camarones o hemolinfa es el tejido de transporte y uno de los principales de tejido de reserva de nutrimentos. Ahí se encuentran las moléculas nutricionales que son transportadas a los distintos tejidos internos, por lo que pueden ser utilizadas como indicadores del estado nutricional. Entre las moléculas nutricionales están las proteínas que son compuestos constituidos por unidades más sencillas, los aminoácidos. No sólo ocupan una posición central por ser la base para la formación de enzimas, hormonas, hemocianina, componentes de la respuesta inmunitaria, sino que además intervienen directamente en la construcción de tejidos (crecimiento), y en la reparación y mantenimiento de estos. Asimismo son fuente de energía en los procesos catabólicos y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

La hemocianina presente en la hemolinfa es una macromolécula que tiene incorporado el cobre el cual funciona como un sitio activo acarreador de oxígeno (Rainer y Brouwer, 1993; Van Holde *et al.*, 2001) y representa del 60-95% de total de proteínas en la hemolinfa de crustáceos (Djanmah 1970). Este componente sanguíneo ha resultado ser de un indicador fisiológico en animales expuestos a diferentes condiciones de amonio (Chen y Chen, 1993; Chen *et al.*, 1994) y nitrito (Cheng y Chen 1999), alta y baja salinidad (Gilles, 1977; Boone y Schoffeniels, 1979), hipoxia (Hagerman, 1986), diferentes niveles de inclusión

de carbohidratos/proteínas dietéticos (Rosas *et al* 2001b), condición de inanición (Pascual *et al.* 2006).

La respiración (R) en los organismos heterótrofos se inicia con la glucólisis y termina con la fosforilación oxidativa, por lo que la cantidad de oxígeno consumido por un animal tiene un equivalente de energía en términos de moléculas de ATP (Zubay, 1983). La cantidad de energía producida en los procesos catabólicos acoplados al ciclo de Krebs, se encuentra dentro de la energía invertida en la respiración (Lucas, 1993; Guerin y Stickle, 1997; Rosas *et al.* 1998).

Tomando en cuenta que el oxígeno es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria R puede ser medida como consumo de oxígeno por lo que la cantidad de oxígeno consumido por un animal tiene un equivalente de energía en términos de moléculas de ATP, los cuales pueden ser convertidos a unidades de energía convencionales (Joules).

La tasa respiratoria ha sido ampliamente estudiada en crustáceos en relación con la salinidad, la temperatura, el oxígeno disuelto, la cantidad y calidad del alimento, etc., pues es un buen indicador del estado fisiológico de los animales (Alcaraz, *et al.*, 1999, Alongi, 1995, Astall, *et al.*, 1997, Chen and Chen, 1997, Chen and Lin, 1995, Chen and Chia, 1996, Dong, *et al.*, 1994, Eguchi, *et al.*, 1997, Ferraris, *et al.*, 1994, Harris, *et al.*, 1997, Rosas, 1999, Rosas, *et al.*, 2000d., Rosas, *et al.*, 1999, Rosas, *et al.*, 1995, Rosas, *et al.*, 1997, Rosas, *et al.*, 1995, Rosas, *et al.*, 1992, Sanchez, *et al.*, 1991, Savenkoff, *et al.*, 1995, Shin and Chin, 1995, Sun, *et al.*, 1996, Taboada, *et al.*, 1998, Villareal, 1993)

## II. Objetivo

Conocer el efecto de la frecuencia de alimentación en el estado fisiológico de juveniles de camarón (*L. vannamei*)

### Objetivos particulares

1. Evaluar indicadores bioenergéticos: consumo de oxígeno
2. Evaluar indicadores sanguíneos: hemocianina y proteínas totales solubles.

## IV. Materiales y métodos.

### 1. Montaje y mantenimiento de organismos experimentales

#### Materiales

- 6 tinas de 70 L
- Bombas de aireación
- Mangueras
- Piedras de aireación
- Redes de mano de 10 x 10 cm.
- Termómetro
- Piseta con agua destilada
- 60 juveniles de camarón de *L. vannamei*

#### Equipo

- Oxímetro
- Refractómetro
- Balanza granataria



Se utilizarán un total de 60 camarones los cuales serán obtenidos del área de estanques del Laboratorio (UMDI). Los organismos serán colocados en tinas de 70 litros en donde se colocarán 10 animales/tina, los cuales se mantendrán por un periodo de 3 semanas. Antes de ser colocados en las tinas, se pesarán individualmente secándolos con un trapo.

Las tinas contarán con aireación constante y sistema de flujo abierto. Diariamente, por tres semanas que dura el experimento, por la mañana y por la tarde se tomarán parámetros físico-químicos: temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH, y se realizará la limpieza de las tinas (sifoneo). En caso de que haya mudas se cuantificarán. Cada semana se valorará la sobrevivencia.

Las dos condiciones de alimentación serán: organismos alimentados una vez a la semana (10% de su peso corporal) y organismos alimentados diariamente (10% de su peso corporal). Por lo tanto, las tinas se distribuirán en dos grupos de 3 tinas (cada grupo contará con tres repeticiones). Véase tabla 1.

Tabla 1

Tratamiento	Número total de organismos
A: Una vez por semana	n=30; 10 camarones/tina (3 tinas)
B: Diariamente	n=30; 10 camarones/tina (3 tinas)

Todos los animales serán muestreados al mismo tiempo al término de las tres semanas que dura el experimento.

## 2 Evaluación de indicadores bioenergéticos: consumo de oxígeno

### Materiales

- 3 camarones juveniles de *L. vannamei* del tratamiento A
- 3 camarones juveniles de *L. vannamei* del tratamiento B
- Franela
- Redes de mano de 10 x 10 cm.

### Equipo:

- Siete cámaras respirométricas de 2 L
- Oxímetro fluorométrico de 10 canales (Oxy-10)
- Balanza granataria

La medición del consumo de oxígeno se hace utilizando preferentemente un sistema de flujo continuo.

Tomando en cuenta que la Respiración de rutina se define como la energía invertida en actividad espontánea y en ausencia de alimento, los animales permanecerán en ayuno por 24 horas antes de realizarse las mediciones. En ése mismo tiempo, se colocarán los camarones en las cámaras respirométricas (Fig. 1), con lo cual se reduce el efecto de la manipulación. Se seleccionarán al azar tres camarones del tratamiento A y tres del tratamiento B, uno por cada tina réplica, Además debe haber una cámara a la que no se le colocará animal y servirá de cámara control para así incluir en los cálculos el efecto del consumo de oxígeno de bacterias y algas presentes en el agua.

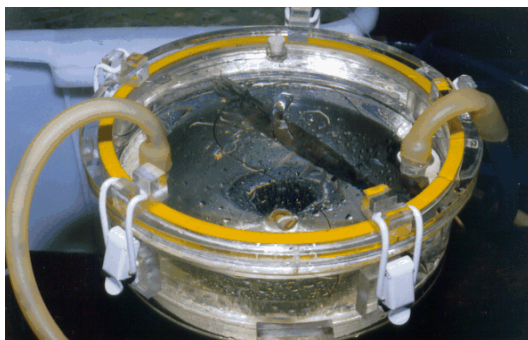


Fig. 1 Cámara respirométrica con un camarón dentro

Los animales serán colocados en las cámaras previamente llenadas con agua de mar y las cuales deberán de estar conectadas al sistema de flujo de agua del sistema de recirculación. Al momento de colocar a los animales y sellar las cámaras, se debe de tener mucho cuidado para que no queden burbujas de aire ni alguna fuga de agua. Esto es particularmente importante pues las fugas pueden alterar el flujo de agua y por ende los cálculos del consumo de oxígeno. Los animales permanecerán en estas condiciones 2 horas, tiempo que será considerado como el período de aclimatación al sistema. Asimismo este intervalo de tiempo se considera suficiente para reducir el estrés producido por la manipulación efectuada a los animales durante su colecta y traslado desde los tanques experimentales y hacia las cámaras respirométricas.

La concentración de oxígeno se determinará utilizando un oxímetro fluorométrico de 10 canales acoplado a un sistema de registro computarizado. Este sistema permite evaluar los niveles de oxígeno a la entrada y salida de cada cámara en forma simultánea y con intervalos de hasta 15 segundos entre cada medición.



El consumo de oxígeno se determinará a partir de la diferencia entre la concentración de oxígeno del agua que entra y sale de las cámaras. Este valor será multiplicado por la velocidad con que pasa el agua a través de las cámaras:

$$VO_2 = [(O_{2e} - O_{2s}) \times F] / P_c$$

Donde

$VO_2$  = consumo de oxígeno en  $mgO_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ,

$O_{2e}$  = concentración de oxígeno en  $mg \text{ L}^{-1}$  obtenida a la entrada de la cámara,

$O_{2s}$  = concentración de oxígeno en  $mg \text{ L}^{-1}$  obtenida a la salida de la cámara,

F= flujo en L h<sup>-1</sup> y  
Pc = peso corporal húmedo (g).

En este sistema, el electrodo es colocado en una pieza tipo "T" a la salida de cada cámara. En tales circunstancias es posible obtener mediciones del consumo de oxígeno frecuentemente lo que permite establecer con mucha precisión el tiempo de aclimatación, la respiración de rutina, y los efectos que tiene el alimento en el metabolismo de los animales.

### **Consumo de oxígeno de rutina.**

Una vez que los animales se han aclimatado a la cámara se procederá a registrar el periodo que será utilizado para la determinación del consumo de oxígeno de rutina el cual se determina en organismos que han permanecido 24 horas en ayuno por lo que es preciso que los organismos en los tanques de aclimatación no sean alimentados un día antes de realizar este experimento.

### **Consumo de oxígeno de organismos alimentados.**

Una vez que el periodo de metabolismo de rutina ha concluido se procederá a alimentar a los animales en las mismas cámaras respirométricas. A cada animal se le proporcionará la cantidad de alimento que corresponda con su peso equivalente al 10 % de su peso corporal. El alimento será colocado en las cámaras aprovechando el orificio superior cubierto con un tapón de goma (# 00).

El registro de las horas será - .Al término de estas horas los animales se sacan de las cámaras y se secan con un lienzo y se pesan en la balanza.

Es importante aclarar que lo que se refiere al cierre y ajuste los volúmenes de paso utilizando las llaves con que cuentan las cámara lo consultará con el profesor responsable de la práctica, al igual que lo que se refiera a la calibración del oxímetro, ya que este equipo requiere de una preparación y conocimientos de cómputo que no son objeto del presente curso.

## **3 Evaluación de indicadores sanguíneos: hemocianina y proteínas totales solubles**

### **a) Manejo de los organismos previo a extracción de hemolinfa**

#### **Materiales**

- Hilera para transportar camarones
- Contenedor con agua congelada (para bajar la temperatura)
- 60 camarones juveniles de *L. vannamei*
- Termómetro 0 - 50 °C

El manejo de los animales antes de la toma de muestras de hemolinfa es un aspecto crucial en este tipo de análisis. La manipulación en sí misma puede alterar de manera significativa los componentes sanguíneos, por lo que antes del muestreo de extracción de la sangre (hemolinfa), los camarones se deben introducir en un baño frío (5°C por debajo de la temperatura inicial) para disminuir su metabolismo. Asimismo, deben estar en ayuno previo de 12 horas.

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

Se prepara el recipiente (hielera, cubeta, tara) en donde van a ser transportados los organismos al laboratorio antes de la extracción de la hemolinfa. Se llena el recipiente a la mitad con agua en la que han sido mantenidos los camarones, y se toma la temperatura. Posteriormente introduzca un contenedor con agua congelada manteniéndolo hasta que la temperatura haya disminuido 5 °C por debajo del registro inicial. En todo momento debe de evitarse una manipulación excesiva de los camarones.

#### **a) Obtención de Hemolinfa**

##### **Materiales**

- 5 portaobjetos y
- 5 cubreobjetos
- 70 jeringas hipodérmicas de 1 ml, desechables
- 30 ml Solución anticoagulante para camarón (SIC-EDTA)
- 2 Placas congelantes
- Franela
- 70 cuadros (4 x 4cm) de Papel parafilm
- Papel secante suave (que no deje pelusa)
- 60 cuadros (10 x5 cm) de papel aluminio
- Recipiente con agua de jabón
- Pisseta con agua destilada
- Tijeras de disección

##### **Equipo**

- Balanza granataria

Una vez que los animales han sido acondicionados a la baja temperatura y la luz ambiental (cinco minutos aproximadamente), es posible tomar las muestras de sangre. Al momento de extraer al animal, debe cuidarse el alterar lo menos posible a los que quedan en la tara/hielera. Como primer paso, es necesario secar perfectamente al organismo para evitar un posible contacto entre la hemolinfa y el agua.

Para extraer la sangre deberá utilizar una jeringa desechable hipodérmica. La jeringa deberá contener aproximadamente 100 µL de solución anticoagulante fría (2-8 °C): Solución Isotónica para Camarón (SIC-EDTA) (Vargas-Albores et al., 1993).

Es necesario resaltar la importancia del cuidado en la condición termal (2-8 °C), tanto en las soluciones (SIC-EDTA) como el manejo y mantenimiento de las muestras, por el desencadenamiento del proceso de coagulación del tejido sanguíneo desde el momento de extraer la hemolinfa por el contacto con el aire y con el cambio de temperatura. Justo antes de la extracción de sangre, la solución anticoagulante debe descartarse completamente. La hemolinfa se extrae del seno ventrolateral del abdomen

con ayuda de la jeringa. La aguja se inserta suavemente a través de la membrana articular de la quinta pata, para tener acceso al seno.

Lentamente se desliza la aguja y, al mismo tiempo, se retira suavemente el émbolo de la jeringa, de tal forma que al momento en que la aguja entre en contacto con la sangre ésta pueda fluir hacia la jeringa. Esta acción permitirá que no se formen burbujas en la hemolinfa, evitando así que se acelere el proceso de coagulación y, con ello, la alteración de los componentes sanguíneos.

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

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



Fig. 1. Toma de hemolinfa del camarón y disposición en placa congelante con parafilm

Después de extraer la hemolinfa se pesa al organismo en la balanza. Posteriormente, se corta el urópodo derecho (viendo al camarón en posición dorsal) y se pone en el portaobjetos con una gota de agua de mar. En el portaobjetos se irán colocando uno a uno los urópodos de cada camarón.

Posteriormente se pone al camarón en papel aluminio identificado para ponerlo en la estufa a 60 °C peso hasta que alcance peso constante.

En la hemolinfa depositada en el parafilm se evaluarán los siguientes indicadores sanguíneos:

## 1 Hemocianina

### Materiales

- 2 cajas con puntas para micropipeta (2-200  $\mu\text{L}$ )
- 1 Caja con puntas para micropipeta (100-1000  $\mu\text{L}$ )
- Vaso de precipitado con 100 ml de agua destilada
- 2 celdas Ultravioleta (UV) para espectrofotómetro
- Papel secante suave (que no deje pelusa)

- Recipiente con agua de jabón
- Pisseta con agua destilada

### Equipo

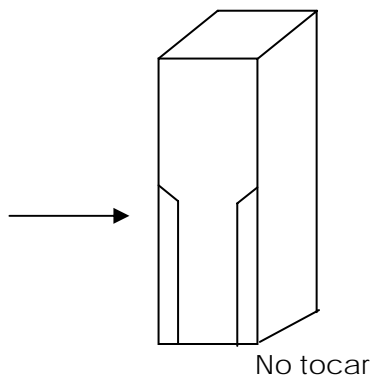
- Micropipeta de 2 - 20  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de 100 - 1000  $\mu\text{L}$
- Espectrofotómetro con lámpara de UV (absorbancia 335 nanómetros (nm))

Para evaluar la hemocinana se requiere del espectrofotómetro y este deberá estar encendido y colocado en una longitud de onda de 335 nm. Debe asegurarse que la lámpara de UV se encuentre activada por lo menos 30 minutos antes de su uso.

Se coloca una celda de ultravioleta (UV) de 1 ml en el espectro la cual deberá contener 990  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se calibra el espectro a cero de absorbancia. Se debe tener cuidado de no tocar con los dedos los lados de la cubeta UV por donde el espectrofotómetro lee la absorbancia, y de limpiarla con un papel suave (que no deje pelusa) antes de meterla al espectrofotómetro.



Fig. Espectrofotómetro



Con una micropipeta se toman 10  $\mu\text{L}$  de la hemolinfa depositada en el parafilm y se mezclan con los 990  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La mezcla se logra al succionar y pulsar varias veces el contenido de la punta de la micropipeta. Una vez hecho esto, se revisa que la cubeta no contenga burbujas, ni marcas de dedos, y se coloca en el espectro. Se lee la absorbancia tal y como lo hizo cuando calibró a cero con el agua destilada. Anote el valor obtenido. En cada análisis se cambia el agua de la cubeta, se enjuaga dos veces con agua destilada, se seca con papel suave y se repite la operación. En caso de ser necesario, se pueden almacenar las muestras a 2-8 °C hasta por 24 horas, para lo cual la dilución de los 10  $\mu\text{L}$  de hemolinfa en 990  $\mu\text{L}$  de agua destilada puede realizarse en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, y al momento de la lectura en el espectrofotómetro, se vacía en la cubeta UV.

## 2 Proteínas totales.

### Materiales

- 60 tubos Eppendorf de 1.5 ml con 40  $\mu\text{L}$  de SIC-EDTA
- 60 tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Solución anticoagulante para camarón (SIC-EDTA)
- 2 cajas con puntas para micropipeta (2-200  $\mu\text{L}$ )

- Vaso de precipitado con 100 ml con agua destilada
- Recipiente frío para colocar los tubos Eppendorf (2-8 °C)
- Recipiente con agua de jabón
- Piseta con agua destilada
- Papel secante

### Equipo

- Micropipeta de 2 – 20  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de 20 - 200  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de 100–1000  $\mu\text{L}$
- Centrifuga refrigerada
- Refractómetro de proteínas

Debido a la susceptibilidad de la hemolinfa para coagularse al entrar en contacto con el aire y con el cambio de temperatura, es necesario diluir la hemolinfa en el SIC-EDTA frío (2-8 °C): por cada volumen de hemolinfa se requieren dos de SIC-EDTA. Los tubos Eppendorf (1.5 ml) deben estar previamente llenados con SIC-EDTA (2-8°C), y marcados de forma numérica progresiva con plumón indeleble (uno por cada muestra de camarón).

Se toman 20  $\mu\text{L}$  de hemolinfa y se mezcla con los 40  $\mu\text{L}$  de la solución anticoagulante contenida en el tubo Eppendorf. Ya con la hemolinfa diluida, los tubos Eppendorf se centrifugan a 800 g (2940 revoluciones por minuto (rpm), por 5 minutos a 4 °C. Las muestras con hemolinfa + SIC-EDTA pueden mantenerse en 2-8°C hasta 4 horas, antes de ser centrifugadas.

Después de centrifugar se retira el sobrenadante (plasma + SIC-EDTA) de los tubos Eppendorf, introduciendo lentamente la punta de la micropipeta sin tocar el fondo, donde es posible observar el paquete celular, el cual para este tipo de análisis no interesa.

El sobrenadante se deposita en tubos Eppendorf nuevos y marcados con la misma secuencia de números que se siguió para las muestras de sangre. Los tubos con plasma siempre deben mantenerse a una temperatura de 2-8 °C.

Antes de poner la muestra en el refractómetro Se limpia el lector del refractómetro con el agua destilada y se seca. Se toman 10  $\mu\text{L}$  de plasma y se colocan en el lector. Se toma la lectura de la columna izquierda la cual registra el valor en g/100 ml. Se hacen dos lecturas por muestra.

## 4 Estadio de muda

### Materiales

- Portaobjetos con urópodos
- Piseta con agua destilada
- Papel secante

### Equipo

- Microscopio óptico

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

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

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

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

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

#### **IV Procesamiento de datos**

##### **a) Indicadores bioenergéticos**

El consumo de oxígeno se calcula mediante la fórmula:

$$VO_2 = ([O_2]_{\text{entrada}} - [O_2]_{\text{salida}}) * F,$$

Donde:

$VO_2$  = consumo de oxígeno expresado en mg de  $O_2$  por hora por animal

$[O_2]_{\text{entrada}}$  = concentración en mg por litro de  $O_2$  en el agua que entra a la cámara respirométrica,

$[O_2]_{\text{salida}}$  = concentración en mg por litro de  $O_2$  en el agua que sale de la cámara respirométrica,

F = velocidad o flujo del agua que pasa a través de la cámara respirométrica expresada en litros por hora.

El programa de registro del oxímetro multicanal, los datos de consumo de oxígeno son capturados en forma de texto y deben ser transformados a datos nominales y colocados en columnas en una hoja del Excel. Para lo cual se requiere elegir "importar" dentro de las opciones del programa. A la hora de importar, es importante elegir la opción de separar columnas con el fin de que los datos sean llevados de esa forma a la página de trabajo. Una vez hecho esto en la parte superior aparecerán los datos clasificados de una forma similar a la que se presenta en el siguiente ejemplo:



13/10/2007/12:16 p.m. SW ver:OXY10v3\_33

Header Ch-5

Description:

IDENTIFICATION

PHIboard number : v1211060

PM number : 00000000

Serial number : OXY-10-04-006-----

MUX channel : ON - 05

PARAMETERS

Signal LED current: 030

Ref LED current : 043

Ref LED amplitude : 88427

Frequency : 006

Sending interval : 0001

Averaging : 2

Internal temp : 20.0 C

SYSTEM SETTINGS

APL function : ON

Temp compensation : OFF

Analog out : OFF

RS232 echo : OFF

Oxygen unit : %a.s.

CALIBRATION

Sensor type : 2

0%a.s.phase 1 : 58.20 at 026.0-C amp 046000

100.00%a.s.phase 2: 26.95 at 027.0-C amp 020500

Date (ddmmyy) : 121007

Pressure (mBar) : 1013

FIRMWARE

Code 3.016 (IAP) : 08/20/04, 09:50:56

Xilinx built : 01/05/04 (MM/DD/YY)

En estos datos se encuentran los datos de calibración y los parámetros de control del programa de registro. Para los detalles pregunte al profesor responsable.

En la parte inferior de la página de trabajo aparecerán los datos de la siguiente manera:

Pressure [hPa]: 1013

Date/dd:mm:y	Time/hh:mm:ss	Logtime/h	Oxy/mg/l	Phase/-	Amp	Temp/-C
13/10/2007	12:16:51 p.m.	0	8.033	26.65	20232	27.5
13/10/2007	12:17:50 p.m.	0.02	8.005	26.69	20252	27.5
13/10/2007	12:18:50 p.m.	0.03	8.025	26.66	20247	27.5
13/10/2007	12:19:50 p.m.	0.05	7.999	26.69	20265	27.5
13/10/2007	12:20:50 p.m.	0.07	7.995	26.7	20257	27.5
13/10/2007	12:21:50 p.m.	0.08	7.973	26.73	20248	27.5
13/10/2007	12:22:50 p.m.	0.1	7.977	26.72	20254	27.5
13/10/2007	12:23:50 p.m.	0.12	7.94	26.77	20243	27.5
13/10/2007	12:24:50 p.m.	0.13	7.977	26.72	20247	27.5
13/10/2007	12:25:50 p.m.	0.15	7.992	26.7	20261	27.5
13/10/2007	12:26:50 p.m.	0.17	7.943	26.77	20229	27.5
13/10/2007	12:27:50 p.m.	0.18	8.024	26.66	20201	27.5
13/10/2007	12:28:50 p.m.	0.2	7.994	26.7	20189	27.5
13/10/2007	12:29:50 p.m.	0.22	8	26.69	20190	27.5
13/10/2007	12:30:50 p.m.	0.23	7.974	26.73	20204	27.5
13/10/2007	12:31:50 p.m.	0.25	7.984	26.71	20190	27.5
13/10/2007	12:32:50 p.m.	0.27	8.006	26.68	20201	27.5
13/10/2007	12:33:50 p.m.	0.28	7.972	26.73	20182	27.5
13/10/2007	12:34:50 p.m.	0.3	7.978	26.72	20199	27.5
13/10/2007	12:35:50 p.m.	0.32	7.968	26.73	20183	27.5
13/10/2007	12:36:50 p.m.	0.33	7.949	26.76	20177	27.5
13/10/2007	12:37:50 p.m.	0.35	7.923	26.79	20301	27.5
13/10/2007	12:38:50 p.m.	0.37	7.87	26.86	20324	27.5

Como se puede apreciar, cada dato incluye la fecha, hora de registro, tiempo (horas) contabilizado desde el inicio del registro, la concentración de oxígeno (mg/L), la fase, el amperaje (datos del electrodo) y la temperatura de registro.

Una página será obtenida por cada cámara respirométrica incluida la cámara control. El cálculo del consumo de oxígeno será efectuado utilizando la ecuación ya descrita y utilizando los datos obtenidos en el cuadro anterior. Se deberán utilizar los datos registrados en el electrodo asignado a la concentración de oxígeno de entrada. Con el fin de facilitar el análisis, esos datos deberán trasladarse a la página de trabajo de cada cámara experimental, véase el siguiente ejemplo:

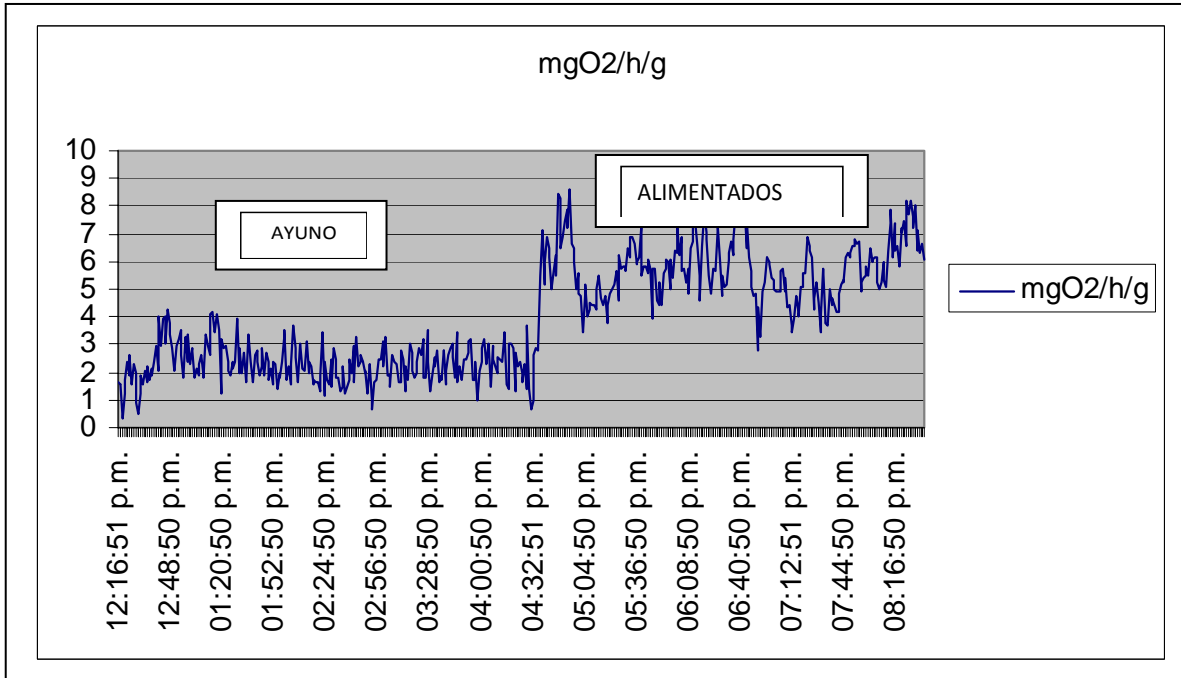
CANAL 1				Canal 1	Control	Canal 1		
SALIDA	ENTRADA	FLUJO	FLUJO	Consumo de oxígeno	Consumo de oxígeno	Consumo de oxígeno		Consumo de oxígeno
Oxy/mg/l	Oxy/mg/l	seg/5 ml	L/h	mgO <sub>2</sub> /h/cám ara	mgO <sub>2</sub> /h/cám ara	mgO <sub>2</sub> /h/cám ara	peso, g	mgO <sub>2</sub> /h/g
8.033	8.382	10.42	1.72744722	0.60287908	0.34630435	0.25657473	0.1539	1.66715225
8.005	8.333	10.42	1.72744722	0.56660269	0.32086957	0.24573312	0.1539	1.59670645
8.025	8.325	10.42	1.72744722	0.51823417	0.46565217	0.05258199	0.1539	0.34166336
7.999	8.327	10.42	1.72744722	0.56660269	0.37369565	0.19290703	0.1539	1.25345702
7.995	8.442	10.42	1.72744722	0.77216891	0.50282609	0.26934282	0.1539	1.75011578
7.973	8.377	10.42	1.72744722	0.69788868	0.32869565	0.36919302	0.1539	2.39891503
7.977	8.463	10.42	1.72744722	0.83953935	0.54978261	0.28975674	0.1539	1.88275984
7.94	8.413	10.42	1.72744722	0.81708253	0.41869565	0.39838688	0.1539	2.58860872
7.977	8.404	10.42	1.72744722	0.73761996	0.50282609	0.23479387	0.1539	1.52562622
7.992	8.383	10.42	1.72744722	0.67543186	0.32086957	0.3545623	0.1539	2.30384858
7.943	8.452	10.42	1.72744722	0.87927063	0.57326087	0.30600976	0.1539	1.98836754
8.024	8.399	10.42	1.72744722	0.64779271	0.51456522	0.13322749	0.1539	0.86567569
7.994	8.526	10.42	1.72744722	0.91900192	0.84326087	0.07574105	0.1539	0.49214457
8	8.422	10.42	1.72744722	0.72898273	0.54	0.18898273	0.1539	1.22795793
7.974	8.447	10.42	1.72744722	0.81708253	0.52826087	0.28882166	0.1539	1.87668398
7.984	8.448	10.42	1.72744722	0.80153551	0.55956522	0.24197029	0.1539	1.5722566
8.006	8.292	10.42	1.72744722	0.4940499	0.17413043	0.31991947	0.1539	2.07874899
7.972	8.399	10.42	1.72744722	0.73761996	0.47934783	0.25827214	0.1539	1.67818152
7.978	8.433	10.42	1.72744722	0.78598848	0.45	0.33598848	0.1539	2.18316104
7.968	8.359	10.42	1.72744722	0.67543186	0.41086957	0.2645623	0.1539	1.71905326
7.949	8.478	10.42	1.72744722	0.91381958	0.58108696	0.33273262	0.1539	2.16200534
7.923	8.478	10.42	1.72744722	0.95873321	0.67304348	0.28568973	0.1539	1.85633351
7.87	8.442	10.42	1.72744722	0.98809981	0.62804348	0.36005633	0.1539	2.3395473

Nótese que la concentración marcada como salida corresponde al canal 1; la referencia de la hora de muestreo y el tiempo están en la misma hoja de Excel en columnas que aquí no aparecen. En este ejemplo el flujo está en dos unidades: seg/5 ml y L/h. El flujo en seg/5 ml contiene los datos originales tomando en consideración la forma en que se midió el flujo, mientras que el segundo (L/h) corresponde a la transformación del flujo medido para ser expresado en litros/hora.

Siguiendo la ecuación ya descrita, el cálculo del consumo de oxígeno resulta de la diferencia entre la concentración de oxígeno a la entrada menos el de la salida, multiplicado por el flujo. De esa forma es posible obtener valores de consumo de oxígeno por cámara expresados en mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>. Este cálculo debe aplicarse a todos los datos, incluyendo a la cámara control. Una vez que se tienen los datos procesados de la cámara control, tome esos datos y colóquelos a un lado de los calculados para las cámaras experimentales que contenían animales. En la tabla ejemplo, esos datos aparecen como consumo de oxígeno de la cámara control.

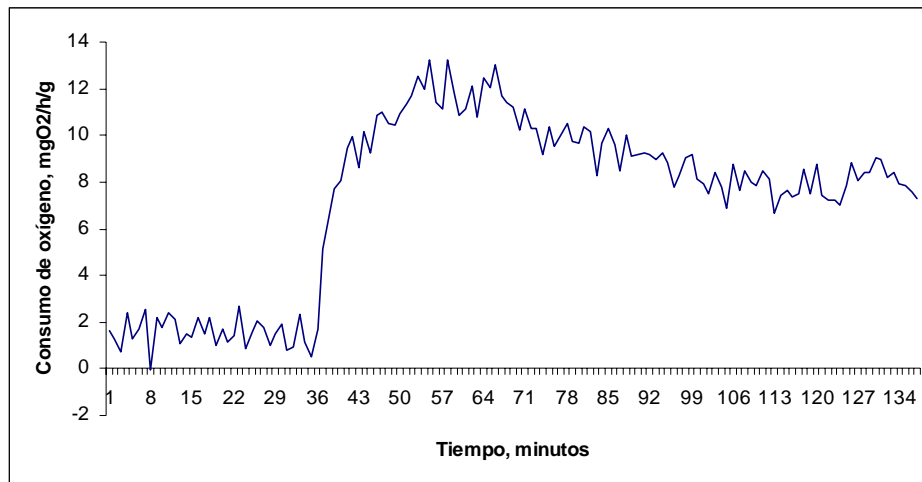
Una vez hecho esto, reste el valor de consumo de oxígeno de la cámara control al obtenido de la cámara experimental y divida el valor obtenido entre el peso fresco del camarón estudiado. Así tendrá los valores de consumo de oxígeno en mg O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> peso húmedo, que aparecen en la última columna del ejemplo anterior.

Como producto de este análisis será posible obtener una gráfica para cada cámara como la que se muestra a continuación:



El registro muestra los datos obtenidos de los animales en ayuno y después de que fueron alimentados. La diferencia entre el consumo de oxígeno promedio en ayuno y el máximo promedio después de la alimentación es considerada como el producto del trabajo metabólico asociado con las transformaciones mecánicas y bioquímicas del alimento ingerido (Rica, donde ica es el incremento de calor aparente).

Con los valores de consumo de oxígeno obtenidos de cada cámara construya una gráfica en la cual haga un resumen de todos los organismos experimentales medidos de un tratamiento determinado, como la que se presenta en el siguiente ejemplo:



Nótese que en el eje X se han colocado los minutos que los animales pasaron durante todo el período experimental. Con estos datos se calcula el consumo de oxígeno necesario para las transformaciones mecánicas y bioquímicas del alimento ingerido (Rica):

$$R_{Ica} = R_{max} - R_{rut}$$

$R_{max}$ = consumo de oxígeno máximo obtenido después de alimentar

$R_{rut}$ = consumo de oxígeno de los animales con 24 h de ayuno

## b) Indicadores sanguíneos

### 1. Hemocianina

La concentración de hemocianina (Hc) se calcula utilizando el coeficiente de extinción  $\epsilon = 17.26$ .

Ejemplo: Se tiene un valor de absorbancia de 0.235, entonces:

$$Hc = (0.235/17.26) \times FD$$

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

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

### 2. Proteínas totales (mg/ml)

La concentración de proteínas totales en mg/ml se calcula:

$$\text{Proteínas totales en mg/ml} = (\text{valor de refractómetro}) (10)(FD)$$

Donde FD es el factor de dilución = 3 porque una parte de hemolinfa se diluyó en dos partes del anticoagulante.

Ejemplo: se tiene un valor de 6.6, entonces:

$$\text{Proteínas totales en mg/ml} = (6.6) (10)(3) = 198 \text{ mg/ml}$$

### 3. Con el cálculo de todos los indicadores, considere a los organismos en el estadio C de intermuda para:

- Graficar el crecimiento y la sobrevivencia en las dos condiciones experimentales
- Graficar el consumo de oxígeno de los organismos de ambas condiciones experimentales
- Graficar la concentración de hemocianina y de las proteínas totales de los organismos en ambas condiciones experimentales.

## VI. Análisis y Discusión de los datos.

Discuta los resultados obtenidos tomando en cuenta los aspectos de la biología de los camarones del género *Litopenaeus* y en relación a la adaptación fisiológica.

## Literatura Recomendada

- Boone and Schoffeniels, 1979 W.R. Boone and E. Schoffeniels, Haemocyanin synthesis during hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L.), *Comp. Biochem. Physiol.* 63B (1979), pp. 207–214.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Leung-Trujillo, J.R., 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture* 122, 133-146.
- Chen, J.C., Cheng, S.-Y., 1993. Hemolymph PCO<sub>2</sub>, hemocyanin, protein level and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia. *Aquat. Toxicol.* 27, 281– 292.
- Chen, J. Y J. Lin. 1998. Osmotic concentration and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles reared at different salinity and temperature levels. *Aquaculture* 164: 173-181.
- Dall, W., Smith, D.M., 1986. Oxygen consumption and ammonia-N excretion in fed and starved tiger prawns *Penaeus esculentus* Haswell. *Aquaculture* 55, 23-33.
- Decamp, O., Cody, J., Conquest, L., Delanoy, G., Tacon, A., 2003. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquac Research* 34, 345-355.
- Ferraris, R.P. Parado-Esteva, J. M. Ladia. y E.G. de Jesús. 1998. Effect of salinity on the osmotic, chloride, total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). *comp. bioch. Physiol.* 85A(4): 701-708.
- Gilles R. (1977). Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A, 109 114.
- Guerim, J.L y W.B. Stickle. 1997. Effect of salinity on survival and bioenergetics of juveniles lesser blue crabs, *Callinectes similis*. *Marine Biology* 129:63-69.
- Hall, M.R., van Ham, E.H., 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 290–299.
- Hill, R.W 1997. Energy Metabolism y Thermal Relationship. P 7-57. En: *Comparative Physiology of Animals: An Environmental Approach*. Harper & Row, publishers. New York, USA. 656 pp.
- Hagerman, 1986 L. Hagerman, Haemocyanin concentration in the shrimp, *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia, *Comp. Biochem. Physiol.* 85A (1986), pp. 721–724.
- Lucas, A., 1993. Biotnergtique des Animaux Aquatiques. Masson, Paris, p. 180.
- Mair, J.M., 1980. Salinity and water type preferences of four species of postlarval shrimp (*Penaeus*) from Wets México. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 45, 69-82.

- Mayzaud,P., Conover,R.J., 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 45, 289-302.
- McFarland,W.N., Lee,B.D., 1963. Osmotic and ionic concentrations of penaeid shrimps of Texas. *Bull. mar Sci. Gulf Caribb.* 13, 391-417.
- McGraw,W.J., Davies,D.A., Teichert-Coddington,D.R., Rouse,D.B., 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint and rate of salinity reduction. *Journal of the World Aquaculture Society* 33, 78-84.
- Ogle,J.T., Beaugez,K., Lotz,J.M., 1992. Effects of salinity on survival and growth of postlarval *Penaeus vannamei*. *Gulf Research Reports* 8(4), 415-421.
- Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Gaxiola, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E., Rosas, C. 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 251:416-429 p
- Ponce-Palafox,J., Martínez-Palacios,C.A., Ross,L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juveniles white shrimp *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107-115.
- Racotta, I.S., Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *P. vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 351–356.
- Rainer, J y M. Brouwer. 1993. Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Com. Biochem. Physiol.* 104B (1): 69-73.
- Regnault,M., 1981. Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Crangon crangon* L. metabolic response to prolonged starvation. *Journal Comparative Physiology* 141, 549-555.
- Rosas, C., López,N., Mercado,P., Martinez,E., 2001. Effect of salinity acclimation on oxygen consumption of white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal Crustacean Biology* 21(4), 279-292.
- Rosas, C., Cuzon, G. Gaxiola, G., LepPriol, C., Pascual, C., Rossigniol, J., Contreras, F., Sánchez, A., and Van Wormhoudt, A. 2001a. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 259: 1-22.
- Rosas, C., Cuzon, G., Taboada, C., Pascual, G. Gaxiola A., and Van Wormhoudt, A. 2001b. Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, decapoda: Penaeidae). *Aquac. Res.* 32: 1-20.
- Rosas, C., Sanchez, A., Diaz-Iglesia, E., Brito, R., Martinez, E., Soto, L.A., 1997. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae (PL sub(10–18)) exposed to salinity changes. *Aquaculture* 152, 259–272.

- Sánchez, A., Pascual C., Sánchez A., Vargas-Alvares F., Le Moullac G., Rosas C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198: 13-28.
- Santos, A.E y R. Keller. 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (2): 343-381.
- Van Holde, K., K., Miller, y H. Decker (2001). Hemocyanins and invertebrate Evolution. *J. Biol. Chem.* 276 (19): 15563-15566.
- Vargas Albores, F., Guzmán, M.A. y Ochoa, J.L. 1993. An anticoagulant solution for hemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem Physiol*, 106A: 299-303.
- Vernberg, J.L., 1983. Respiratory adaptations. In: Vernberg, J.L., Vernberg, W. (Eds.), *The biology of crustacean*. Academic Press, Inc., pp. 147-215.
- Vinagre, A.S., Da Silva, R.S., 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A, 579- 583.
- Webster, S.G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.* 199: 1579-1585.
- Zumbay, G. *Biochemistry* 1983. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.. U.S.A. 1268 pp.

## Glosario

**Absorbancia.-** Cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra. Se llama densidad óptica a la absorbancia de un elemento óptico para una longitud de onda determinada; a veces la misma expresión se usa sin referencia a una longitud de onda específica.

**Acclimatación.-** cambio persistente en una función específica debido a una prolongada exposición a una condición ambiental.

**ATP.-** Trifosfato de adenosina o adenosin trifosfato; es una molécula que consta de enlaces iónicos de alto contenido energético que interviene en la actividad celular formada por molécula

**Bioenergética.-** Rama de la biología que estudia los procesos fisiológicos que intervienen en la obtención y uso de energía

**Carbohidratos.-** Compuestos orgánicos que están compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno, como ejemplos están la glucosa y el almidón.

**Catabolismo.-** Degradación de moléculas complejas a más simples.

**Ciclo de Krebs.-** Secuencia de reacciones químicas que descompone al piruvato en bióxido de carbono e hidrógeno.



**Ecdisis.**- Fenómeno cíclico que está establecido por el desprendimiento del caparazón viejo (exoesqueleto o exuvia).

**Enzima.**- proteína que acelera una reacción química, catalizador orgánico

**Exoesqueleto.**- Esqueleto externo. También llamado exuvia

**Fosforilación oxidativa.**- Proceso bioquímico que ocurre en las células, y es el proceso metabólico final (catabolismo) de la respiración celular, tras la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico y en el cual se libera energía.

**Glucólisis.**- Vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula. Proceso anaerobio

**Hemolinfa:** Líquido circulatorio de los artrópodos, moluscos, etc. análogo a la sangre de los vertebrados.

**Hemocianina:** Proteína presente en la sangre de los artrópodos, moluscos, etc. Se encarga del transporte de oxígeno, presenta dos átomos de cobre en su centro activo.

**Heterótrofo.**- Organismo dependiente de la energía aportada por compuestos orgánicos obtenidos por la ingestión de otros animales o plantas

**Homeocinesis.**- La condición de estabilidad interna relativa mantenida por los sistemas de control fisiológico y energético

**Membrana articular.**- Membrana que une secciones del esqueleto cuticular de los apéndices en los artrópodos

**Metabolismo.**- La totalidad de procesos físicos y químicos implicados en el anabolismo, catabolismo y energética celular

**Metabolitos.**- Sustancia producida o utilizada durante el metabolismo.

**Respiración.**- Intercambio de gases entre una célula y su medio; entre un organismo y su ambiente. La respiración celular es una serie de procesos aerobios y anaerobios por los cuales se moviliza energía mediante la ruptura de compuestos orgánicos

**Proteínas.**- Compuestos constituidos por unidades más sencillas, los aminoácidos. Ocupan una posición central por ser la base para la formación de enzimas, hormonas, hemocianina, componentes de la respuesta inmunitaria, sino que además intervienen directamente en la construcción de tejidos (crecimiento), y en la reparación y mantenimiento de éstos. Asimismo, son fuente de energía en los procesos catabólicos y son esenciales en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

**Respirómetro.**- Sistema abierto o de flujo en el que se hace pasar una corriente de agua a una velocidad conocida a través de una cámara respirométrica en la que se encuentra el animal objeto de estudio.

**Seno ventrolateral.**- Espacio tisular que forma parte del sistema circulatorio arterial en los crustáceos y que se localiza en la parte ventral del cefalotórax del camarón; la sangre pasa a través del seno y llega a los tejidos y las superficies respiratorias.

**SIC-EDTA.-** Solución isotónica para camarones, con una sal (EDTA), que funciona como anticoagulante.

**Ultravioleta.-** Se refiere a la radiación ultravioleta o radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida entre los 400 ( $4 \times 10^{-7} \text{m}$ ) y los 15 nm ( $1.5 \times 10^{-8} \text{m}$ )

**Urópodos.-** Estructuras ubicadas la parte final del cuerpo de los crustáceos, a continuación del abdomen o pleon, y normalmente son laminares o aplanados