

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A. C.

FISIOLOGÍA DEL ESTRÉS POR EXPOSICIÓN AÉREA EN LA LANGOSTA *Panulirus interruptus*: BALANCE IÓNICO Y METABOLISMO DEL NITRÓGENO.

POR

LOURDES GUADALUPE TEJEDA VALENZUELA.

TESIS APROBADA POR LA
DIRECCIÓN DE TECNOLOGÍA DE AUMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

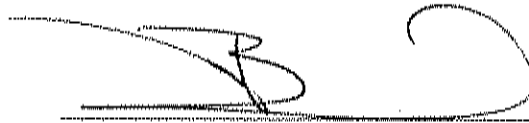
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

SEPTIEMBRE DEL 2002

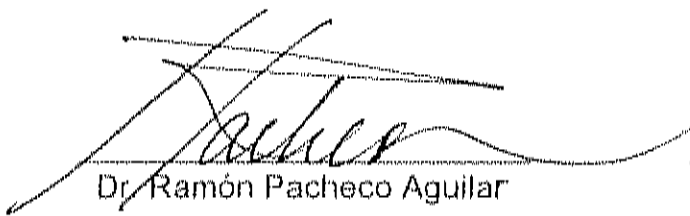
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la QBA Lourdes Guadalupe Tejeda Valenzuela, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en productos marinos, dentro del programa de Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

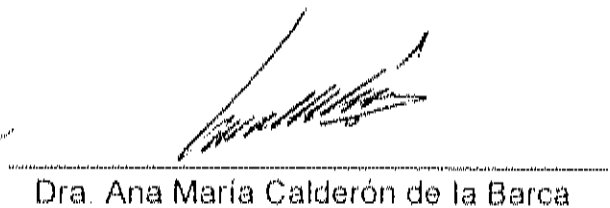


Dra. Silvia Gómez Jiménez

Director de tesis.



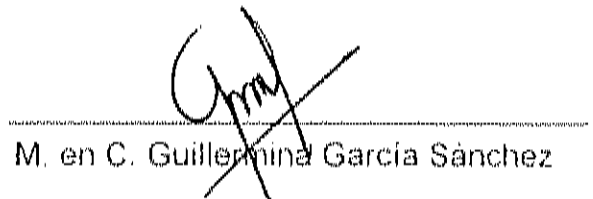
Dr. Ramón Pacheco Aguilar



Dra. Ana María Calderón de la Barca



Dr. Fernando Díaz Herrera

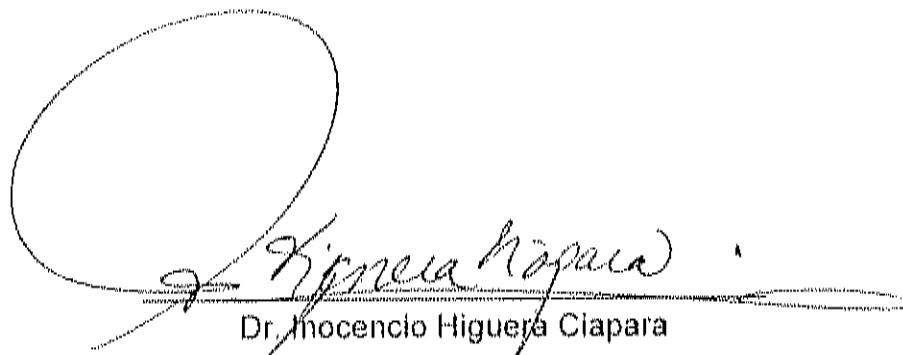


M. en C. Guillermina García Sánchez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD, A. C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos a CIA, A. C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.



Dr. Inocencio Higuera Clapara
Director General

DEDICATORIA

Dejar en una hoja a todos los afectos no es tan fácil, este último peldaño se lo debo a muchas personas.

El haberme dejado seguir entre libros y entender que por este tiempo, aun cuando lo hubiera querido evitar, me absorbió mas el mar, el laboratorio e incluso la computadora,

Aprendí mucho y afortunadamente hoy puedo poner en sus manos mi Título de Maestría.

Con mucho cariño:

A mis padres, Isaias y Lupita;

Mis hermanos, Fely, Jesús y Cecilia. Mi sobrina Valeria;

Mis abuelos Panchita y Jesús.

A mi novio y gran amigo Samuel.

A mis amigos, compañeros de escuela. Y a todos lo que de alguna forma me ayudaron en esta etapa de mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo durante mis estudios de postgrado, y el apoyo al proyecto del que formó parte mi tesis de maestría (I35559-N).

Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por haberme proporcionado los medios necesarios para la obtención del grado de Maestría.

A la Dra. Silvia Gómez Jiménez, por su apoyo y la confianza que depositó en mí durante el tiempo que me llevo realizar esta etapa de mi carrera profesional.

A la Dra. Ana María Calderón de la Barca, no solo por haber sido parte de mi comité de Tesis, sino por su apoyo en general. En mi formación académica y las facilidades que me permitieron realizar parte de mi trabajo experimental en laboratorios del área de nutrición.

Al Dr. Ramón Pacheco Aguilar, el Dr., Fernando Díaz Herrera y la M en C. Guillermina García Sánchez quienes formaron parte de mi comité de tesis y me ayudaron con sus sugerencias y evaluaciones de mi trabajo.

A el personal del laboratorio de toxicología, en el aérea de Cs. de los Alimentos, especialmente a Martín Jara, por su ayuda en la parte experimental de mi tesis.

En el área de Nutrición, a Q. B. Francisco Vázquez y a Q. B. Rene Valenzuela, de igual manera por el apoyo durante la parte experimental de mi tesis.

Al personal del área de Productos Marinos, Gisela Carballo, José Nieblas, Guillermina García , María Elena Lugo, así como a Jaime Lizaldi, Carlos Verdugo por el apoyo técnico durante mi trabajo de tesis, ya sea en mis preeliminares, en el experimental y/o en la ayuda con materiales, reactivos y para el montaje de técnicas.

A el personal del Centro de Investigaciones Biológicas, en la Cd. de La Paz, B. C., del laboratorio de Biotecnología, de Bioensayos, por las facilidades

en la utilización de equipo y material para el mantenimiento de las langostas y la realización del experimental.

A la familia Barajas, (Delfino y Griselda), por su ayuda durante mi estancia en la Cd. de La Paz.

Al personal de DICTUS de la Universidad de Sonora, por las facilidades que se me otorgaron para la realización de los preliminares en las instalaciones en Bahía Kino.

Y a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| INDICE DE FIGURAS..... | X |
| INDICE DE TABLAS..... | XIII |
| RESUMEN..... | 1 |
| CAPITULO 1. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE <i>Panulirus</i> <i>interruptus</i> Y SU COMERCIALIZACIÓN EN VIVO..... | 4 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA PESQUERÍA DE LANGOSTA..... | 7 |
| 1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE <i>Panulirus</i> <i>interruptus</i> | 8 |
| 1.3 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL MANEJO EN VIVO DE LA ESPECIE <i>Panulirus interruptus</i> | 12 |
| 1.4 BIBLIOGRAFÍA..... | 17 |
| CAPITULO 2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AÉREA SOBRE ALGUNOS METABOLITOS EN LA HEMOLINFA DE LA LANGOSTA ROJA <i>Panulirus interruptus</i> | 19 |
| 2.1 INTODUCCION..... | 20 |
| 2.1.1 Efecto de la exposición aérea sobre el metabolismo energético de crustáceos..... | 20 |

CONTENIDO

| | Página |
|---|---------------|
| 2.1.2 Regulación del balance ácido-base..... | 22 |
| 2.2 MATERIALES Y METODOS..... | 27 |
| 2.2.1 Captura y mantenimiento de los animales..... | 27 |
| 2.2.2 Experimento de exposición aérea a 7 °C y 20 °C..... | 28 |
| 2.2.3 Reinmersión de los animales por 2 horas..... | 28 |
| 2.2.4 Obtención de hemolinfa..... | 29 |
| 2.2.5 Determinación de lactato..... | 29 |
| 2.2.6 Determinación de pH..... | 31 |
| 2.2.7 Determinación de presión osmótica..... | 32 |
| 2.2.8 determinación de iones..... | 32 |
| 2.2.9 Análisis estadístico..... | 35 |
| 2.3 RESULTADOS..... | 36 |
| 2.3.1 Descripción de variables..... | 36 |
| 2.4 DISCUSIÓN..... | 47 |
| 2.5 BIBLIOGRAFIA..... | 55 |
| CAPITULO 3. EFECTO DE EMERSIÓN SOBRE COMPUESTOS | |
| NITROGENADOS EN LA LANGOSTA <i>Panulirus</i> | |
| <i>interruptus</i> | |
| | 58 |
| 3.1 INTODUCCION..... | 59 |

CONTENIDO

| | Página |
|---|---------------|
| 3.2 MATERIALES Y METODOS..... | 63 |
| 3.2.1 Captura y mantenimiento de los animales..... | 63 |
| 3.2.2 Experimento de exposición aérea a 7 °C y 20 °C... | 64 |
| 3.2.3 Determinación de la tasa de excreción de amoníaco..... | 64 |
| 3.2.4 Tasa de excreción de amoníaco después de 10 horas de emersión..... | 65 |
| 3.2.5 Obtención y manejo de muestras..... | 66 |
| 3.2.6 Determinación de amoníaco..... | 68 |
| 3.2.7 Determinación de proteína en hemolinfa..... | 70 |
| 3.2.8 Determinación de aminoácidos libres..... | 70 |
| 3.2.9 Análisis estadístico..... | 74 |
| 3.3 RESULTADOS..... | 75 |
| 3.3.1 Traslado y mantenimiento de los animales..... | 75 |
| 3.3.2 Compuestos nitrogenados..... | 75 |
| 3.4 DISCUSIÓN..... | 92 |
| 3.5 2BIBLIOGRAFIA..... | 98 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura No. | Titulo | Página |
|------------|--|--------|
| 1 | Zona de distribución y captura de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> en la península de Baja California, México..... | 9 |
| 2 | Langosta <i>Panulirus interruptus</i> del pacífico mexicano | 11 |
| 3 | Procedimientos de manejo en la comercialización de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> . a) y b) captura y traslado a la costa, c) cajas de madera para el transporte vía terrestre | 14 |
| 4 | Modelo de los mecanismos de transporte iónico en células epiteliales de branquias de cangrejos. Resultados de estudios con membranas vesiculares aisladas (Towle 1993)..... | 24 |
| 5 | Toma de muestras de hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> , durante el experimento de emersión | 30 |
| 6 | Valor de lactato en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 37 |
| 7 | Variación del pH registrado en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■) | 39 |
| 8 | Concentración de Mg ⁺⁺ en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 41 |
| 9 | Concentración de Na ⁺ en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 42 |

| | | |
|----|---|----|
| 10 | Concentración de Ca^{++} en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 44 |
| 11 | Concentración de K^+ en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 45 |
| 12 | Variación de la presión osmótica en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 46 |
| 13 | Toma de muestras de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> , durante el experimento de emersión. a) separación abdomen - cefalotórax, b) corte muestra músculo, c) separación cefalotórax, d) obtención muestra hepatopáncreas..... | 67 |
| 14 | Tasa de excreción de amoniaco de la especie <i>Panullirus interruptus</i> , después de una emersión de 10 horas bajo dos temperaturas: 7 °C (⊗) y 20 ° C (■)..... | 76 |
| 15 | Concentración de amoniaco en la hemolinfa de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 78 |
| 16 | Concentración de amoniaco en el músculo de <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 81 |
| 17 | Concentración de protelna en la hemolinfa de <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 83 |
| 18 | Concentración de aminoácidos totales (AAT) en la hemolinfa de <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 84 |
| 19 | Variación en la concentración de algunos AA individuales en (a) hemolinfa, (b) músculo y (c) hepatopáncreas de la langosta <i>Panulirus interrupus</i> , a 7 °C (◆) y 20 ° C (■). | |

| | | |
|----|---|----|
| | Comparación de la concentraciones del grupo control (C) y 10 h de emersión..... | 85 |
| 20 | Variación de la concentración de AA individuales en (a) hemolinfa, (b) músculo y (c) hepatopáncreas en la langosta <i>Panulirus interruptus</i> a 7 °C (◆) y 20 °C (■). Comparación de el grupo de 10 h de emersión y 2 h re reinmersión..... | 86 |
| 21 | Concentración de aminoácidos totales (AAT) en el músculo de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■)..... | 88 |
| 22 | Concentración aminoácidos totales (AAT) en el hepatopáncreas de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■).. | 90 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla No. | Título | Página |
|-----------|--|--------|
| 1 | Etapas de digestión para la determinación de los iones Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ indicando el tiempo de digestión y poder utilizados..... | 34 |
| 2 | Gradiente utilizado para la determinación de aminoácidos por HPLC..... | 72 |
| 3 | Porcentaje de acumulación de amoniaco en hemolinfa y músculo de la langosta <i>Panulirus interruptus</i> durante emersión en ambas temperaturas 7 ° C y 20 ° C | 80 |

RESUMEN

La langosta *Panulirus interruptus*, es una especie de alto valor comercial, la cual se captura en la península de Baja California. Esta langosta, es la principal especie comercializada en vivo en nuestro país. Sin embargo, el estrés provocado en los animales durante el manejo corporal en vivo, provoca cambios en la fisiología y metabolismo de los mismos. Ante la falta de información de los mecanismos de adaptación y los efectos que el comercio en vivo provocan en esta especie de langosta, se realizó un bioensayo de exposición aérea (emersión) de corta duración, evaluando el efecto de temperatura en diversos metabolitos en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas, simulando condiciones, de transporte en vivo, en alta humedad relativa.

Los resultados del presente trabajo se presentan en tres capítulos. El primero "Características de la especie *Panulirus interruptus* y su comercialización en vivo", donde se presentan los antecedentes del tema. En el segundo, "Efecto de exposición aérea sobre algunos metabolitos en la hemolinfa de la langosta roja *Panulirus interruptus*", considerando el balance iónico y metabolismo energético de la langosta. Y finalmente en el capítulo tres, "Efecto de emersión de corta duración sobre compuestos nitrogenados en la langosta *Panulirus interruptus*", se enfoca en la variación de los metabolitos asociados con nitrógeno en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas.

En el primer capítulo se encuentran los resultados del monitoreo en hemolinfa del pH, presión osmótica, así como la concentración de lactato, Mg^{++} , Ca^{++} , Na^+ , K^+ . Las muestras fueron tomadas en períodos de 1, 4, 7, 10 horas de emersión.

Los resultados mostraron un menor efecto sobre las variables en hemolinfa de los animales expuestos a 7 °C en comparación a lo determinado a 20 °C.

20 °C. El valor de pH, presión osmótica, la concentración (de los iones K^+ y Ca^{2+}) no presentaron variación significativa. Únicamente el ion Na^+ registró una disminución de $1241 \pm 600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hasta $6125.0 \pm 534 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, lo que disculpa la posibilidad de un equilibrio suficiente y del mantenimiento en condiciones estables de la lanigiosa *E. in/r, rruptus* por medio de balanceo, intrín y citrinocelulares. Por otra parte a 20 °C, se observó una variabilidad en los diversos parámetros monitorizados, Lactato aumentó de $0.41 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ a $2.5 \pm 0.48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ y el pH disminuyó de 7.138 ± 0.026 a 7.13 ± 0.047 . La activación del metabolismo anaerobio por aumento en la concentración de lactato podría considerarse un factor que favoreció la acidosis en hemolinfa. Se discute si este es el único factor asociado a la acidez registrada. Por otra parte el ion Na^+ aumentó de $4910 \pm 405.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3424 \pm 478 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), por el contrario los iones Ca^{2+} , Cl^- , así como la presión osmótica, no registraron variación. Las variaciones registradas son asociadas al igual que en 7 °C a las reacciones intracelulares en los animales.

En el metabolismo del nitrógeno, fue evidente la acumulación de amoniaco en la hemolinfa de la langosta al ser expuesta a emersión, siendo mayor la acumulación del mismo a 20 °C en comparación a 7 °C.

En inmersión a 7 °C, la tasa de excreción de amoniaco bajo condiciones normales fue de $0.31 \text{ mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, resultando una eliminación de $70 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de amoniaco en los primeros 5 minutos de inmersión (después de un periodo de 10 h de emersión). La concentración de amoniaco, proteínas y aminoácidos totales (AAT) en hemolinfa, así como amoniaco y AAT en músculo y AAT en el páncreas no presentaron diferencias significativas.

En la inmersión a 20 °C, la tasa de excreción bajo condiciones normales fue de $0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ con una eliminación de amoniaco en los primeros 5 minutos de inmersión de $2045 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. El amoniaco en la hemolinfa

aumentó de $420 \pm 313.5 \text{ pmol.L}^{-1}$ a $1022.0 \pm 207.1 \text{ pmol.L}^{-1}$, los AAT en hígado aumentaron de $76.5 \pm 5.1 \text{ pmol.L}^{-1}$ a $114.0 \pm 7.8 \text{ pmol.L}^{-1}$ en músculo los AAT disminuyeron de $125.13 \pm 11.1 \text{ pmol.L}^{-1}$ a $135.1 \pm 15.5 \text{ pmol.L}^{-1}$ y finalmente en hepátomas los AAT disminuyeron de $113.7 \pm 11.3 \text{ pmol.L}^{-1}$ a $211.7 \pm 19.3 \text{ pmol.L}^{-1}$. En este experimento fue evidente la acumulación de amoníaco en hígado, discutiéndose si esto fue el resultado de la acumulación de amoníaco en hígado, discutiéndose si esto fue el resultado de la acumulación de amoníaco en hígado, discutiéndose si esto fue el resultado de la acumulación de amoníaco en hígado. Los AAT no participan en el proceso de desoxificación de amoníaco vía síntesis de aminoácidos, ya que la variación se debe más bien a ajustes intra - extra colulars.

**CAPITULO 1. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE *Panulirus interruptus* Y
SU COMERCIALIZACIÓN EN VIVO.**

1.1 INTRODUCCIÓN

La mayoría de los organismos tienen adaptaciones fisiológicas y metabólicas que les permiten desarrollarse en un medio ambiente determinado, ya sea acuático o terrestre. Sin embargo dentro de la gran diversidad de especies animales, existen algunas capaces de sobrevivir en ambos medios. Entre estos se encuentran los crustáceos y anfibios (O'Mahoney y Full, 1984).

Según Schmitt (1995), la respuesta metabólica a la exposición aérea es variable y depende de las características de cada especie. Las especies habitantes de zonas intermareales y semiterrestres tienen una mejor adaptación a la toma de oxígeno atmosférico debido a que en su medio ambiente el intercambio mareal provoca el contacto con el aire por periodos de tiempo cortos. Esto ha provocado que dichas especies estén más adaptadas a la exposición aérea (Cameron, 1981; Johnson y Uglow, 1985; McMahon y Burgren, 1988; Al-Wassia, 1989). En contraste, las especies que son totalmente acuáticas tienen una menor capacidad para mantener la homeostasis al ser expuestas a un cambio de medio ambiente por no tener mecanismos compensatorios tan eficientes (Schmitt, 1995).

El estudio integral de las modificaciones en el metabolismo y fisiología de crustáceos expuestos al aire ha generado diferentes líneas de investigación. Una de ellas se enfoca en determinar las adaptaciones evolutivas de diversas

especies (crustáceos, incluyendo anfipodos, decápodos e isópodos) para determinar las rutas evolutivas que han seguido en la transición del ambiente marino al terrestre (Greenaway, 1998).

El área ecológica, enfoca su interés hacia los mecanismos que utilizan algunas especies endémicas para sobrevivir a los cambios ambientales (deseccación y altas temperaturas) provocados por la destrucción de su hábitat (Rodríguez - Almaraz y Campos, 1994). Por otra parte, está el interés en el área tecnológica y de comercio de animales en vivo, específicamente de crustáceos de alto valor comercial (Gomez-Jimenez y Rodriguez, 2001; Gomez-Jimenez, 1998; Smitt 1995; Whiteley y Taylor, 1992; Spicer y col., 1990).

En particular el área de investigación del presente trabajo se enfoca hacia el manejo comercial en vivo de una especie de langosta de alto valor comercial del pacífico mexicano.

En la mayoría de los protocolos del comercio en vivo de especies acuáticas, se les expone a condiciones ambientales adversas, en comparación a su medio ambiente normal, originando animales estresados o con algún daño físico aparente. Esto repercute en la pérdida de la calidad intrínseca del producto. Por ello es de suma importancia realizar estudios sobre las respuestas compensatorias de los animales, a los diferentes factores que les provocan e daño parcial o total (altas tasas de mortalidad) durante la cadena de comercialización en vivo.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA PESQUERÍA DE LANGOSTA

La exportación de langosta en el mundo se enfoca principalmente hacia las familias Homaridae, Nephrosidae, Scyllaridae y Paniluridae. Estas se conocen por sus nombres comunes de langosta de tenazas (American lobster, clawed lobster); langosta noruega de tenazas (Norway lobster); langosta plana o zapatera (*Squilla* sp) y langosta espinosa (Spiny lobster). En esta última se encuentran más de 30 especies de 3 géneros: *Panulirus*, *Palinurus* y *Jasus* (Vega-Vazquez y col., 1996).

Los principales países importadores de productos marinos vivos son Japón, China, España y Francia. Por su parte Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Canadá son los principales exportadores (Phillips y col., 1994, FAO, 2002).

En el contexto de nuestro país, las zonas productoras de langostas son principalmente la península de Baja California y el área del mar Caribe (Ayala y col., 1988; Vega-Vazquez y col., 1996). Teniendo las especies con mayor impacto económico en el área de Baja California, en donde se capturan las especies *Panulirus interruptus* (roja), *Panulirus inflatus* (azul), *Panulirus gracilis* (verde) y *Panulirus argus* (caribe).

Por el volumen de captura y valor comercial, la especie, *Panulirus interruptus* es la que tiene mayor importancia comercial, en comparación con las otras

especies mencionadas anteriormente. Específicamente la distribución de la especie *Panulirus interruptus* es desde el estado de California en E.U.A. hasta Isla Santa Margarita B.C.S. (Bahía Todos Santos), (Fig. 1). En la región mas hacia el sur la especie *P. interruptus* se encuentra en menor predominando la especie *P. inflatus* (Ayala y col., 1988; Vega-Vazquez y col., 1996; Gomez-Jimenez, 1988).

Este recurso pesquero es manejado por 26 cooperativas de pescadores, las cuales utilizan sus propios procedimientos de manejo y comercialización, al igual que cada una decide como y a quien vender su producto (Gomez-Jimenez, 1998; Gomez-Jimenez y col., 2001). La derrama por la comercialización de langosta en los años 1997 y 1998 fue alrededor de los 30 millones de dólares con volúmenes de captura de 2552 y 2214 toneladas, respectivamente (FAO, 2002; Semarnap, 2002).

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE *Panulirus interruptus*

Según Ayala y col., 1988, la clasificación taxonómica de la langosta espinosa (Fig. 2) del Pacífico es:

Phylum: Artropoda

Clase: Crustácea

Subclase: Malacostraca

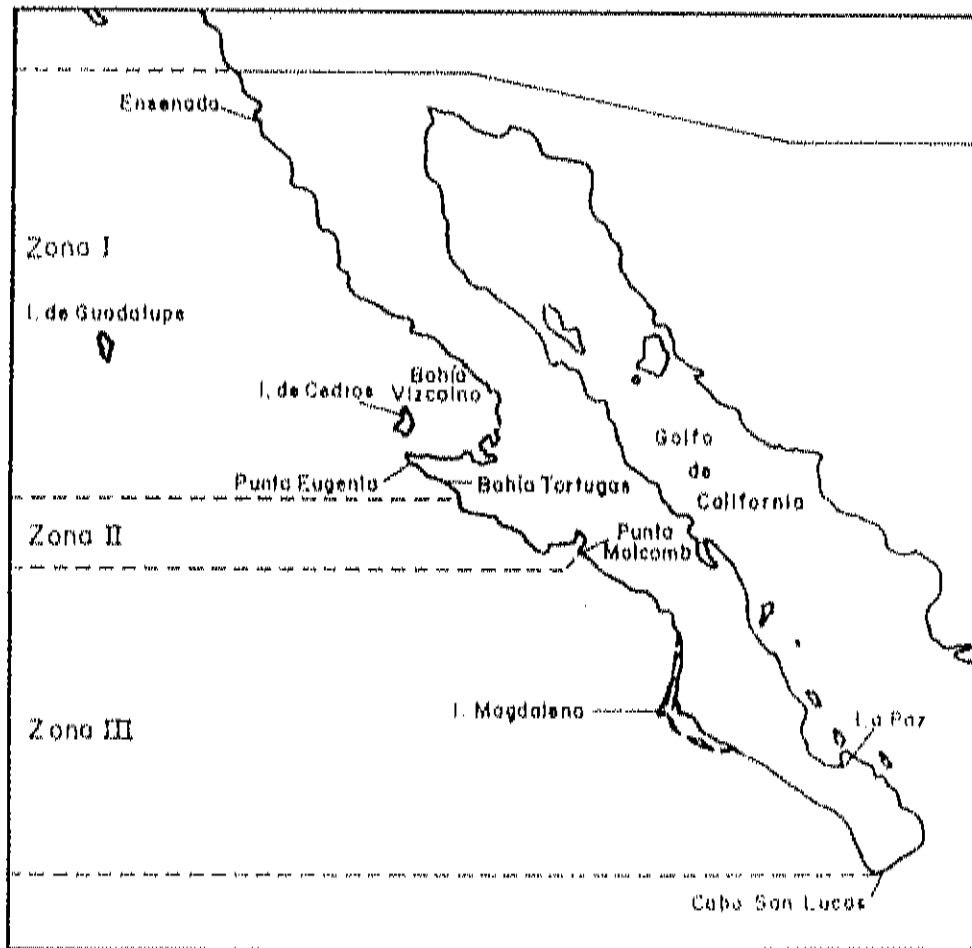


Figura 1. Zona de distribución y captura de la langosta *Panulirus interruptus* en la península de Baja California, México.

Super orden: Eucárida

Orden: Decápoda Suborden: Reptandia

Familia: Palinuridae

Género: *Panulirus* (White 1847)

Especie: *Interruptus* (Randall 1840).

La etapa larvaria de la especie se divide en 11 estadios. Al inicio el animal mide 1.5 mm, llegando a 30 - 32 mm de longitud al final de la etapa larvaria que transcurre en un tiempo entre 8 y 11 meses (Ayala y col., 1988). Después de la etapa larvaria, la siguiente etapa es la transformación a puerulus, donde posee las características de un adulto, pero es incoloro. En esta etapa inicia el crecimiento por medio de la primera muda a postpuerulos (primera etapa juvenil). Como juveniles estos organismos permanecen en el fondo de aguas someras en período de 3 ó 4 años. A medida que los animales alcanzan la madurez sexual, se introducen en aguas mas profundas hasta llegar al primer desove. Las hembras de esta especie pueden desovar una vez al año, esto sucede entre los meses de marzo - septiembre. Algunos estudios sugieren que la madurez sexual para machos y hembras se alcanza a los 3 y 5 años respectivamente (Ayala y col., 1988; Vega-Vazquez y col., 1996).



Figura 2. Langosta *Panulirus interruptus* del pacífico mexicano.

Debido a la importancia de este recurso pesquero, su captura y manejo ha sido regulado en base a estudios biológicos. Por una parte se utiliza una talla mínima comercial para la captura de animales, siendo el rango aceptable entre 82.5 mm y 116 mm de longitud del cefalotórax (CT). Además, basándose en patrones de distribución / abundancia espacial de las especies, se establecieron las épocas de captura y veda para lo cual se dividió el área de captura en 3 zonas. La época de veda en la zona I es del 16 de febrero al 15 de septiembre, en la zona II del 1 de marzo al 30 de septiembre y en la zona III del 1 mayo al 14 de noviembre (Briones y Lozano, 1994; Vega-Vazquez, 1996).

1.3 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL MANEJO EN VIVO DE LA ESPECIE, *Panulirus interruptus*

El transporte de crustáceos en vivo por una parte puede proporcionar mayores ganancias a las pesquerías y a los diversos participantes de la cadena comercial involucrados en ella, con la obtención de mayores ganancias al momento de lograr la venta del producto. Y por otra parte, esto también satisface la demanda de los diversos consumidores por productos de óptima calidad. Sin embargo, en muchas ocasiones los productores no consideran que al extraer a los animales de su medio acuático y exponerlos al aire, éstos realizan adaptaciones fisiológicas y metabólicas para mantener su homeostasis.

Por lo tanto, si los protocolos aplicados en la comercialización no proporcionan a los animales un ambiente que le permita minimizar los problemas fisiológicos y metabólicos, al final del proceso esto se reflejara en la pérdida parcial o total del producto.

Dentro de los procedimientos de manejo en la cadena de comercialización de la langosta *Panulirus interruptus*, Gomez-Jimenez y col., (2001), realizaron un análisis de riesgos y control de puntos críticos desde el proceso de captura hasta el primer punto de venta en una de las 26 cooperativas que manejan este recurso. En este estudio se identificaron algunos puntos en los que la especie se expone al aire por diferentes periodos, dentro de ellos solo describiremos dos: la captura de los animales y el traslado vía terrestre.

El primer período de exposición aérea (Fig. 3 a y b) es la captura de los animales. Los pescadores recolectan las trampas (cajas de madera) que se encuentran mar adentro y las trasladan a la costa, utilizando pequeñas embarcaciones (pangas). En este traslado los animales son expuestos al aire a temperatura ambiente, sin implementar ninguna medida para controlar dicha exposición aérea. (Gomez-Jimenez y col., 2001, Gomez-Jimenez, comunicación personal). Esto tiene mayor importancia hacia los meses de verano, donde las temperaturas llegan hasta los 20 °C (NOAA, 2002). Y precisamente en este

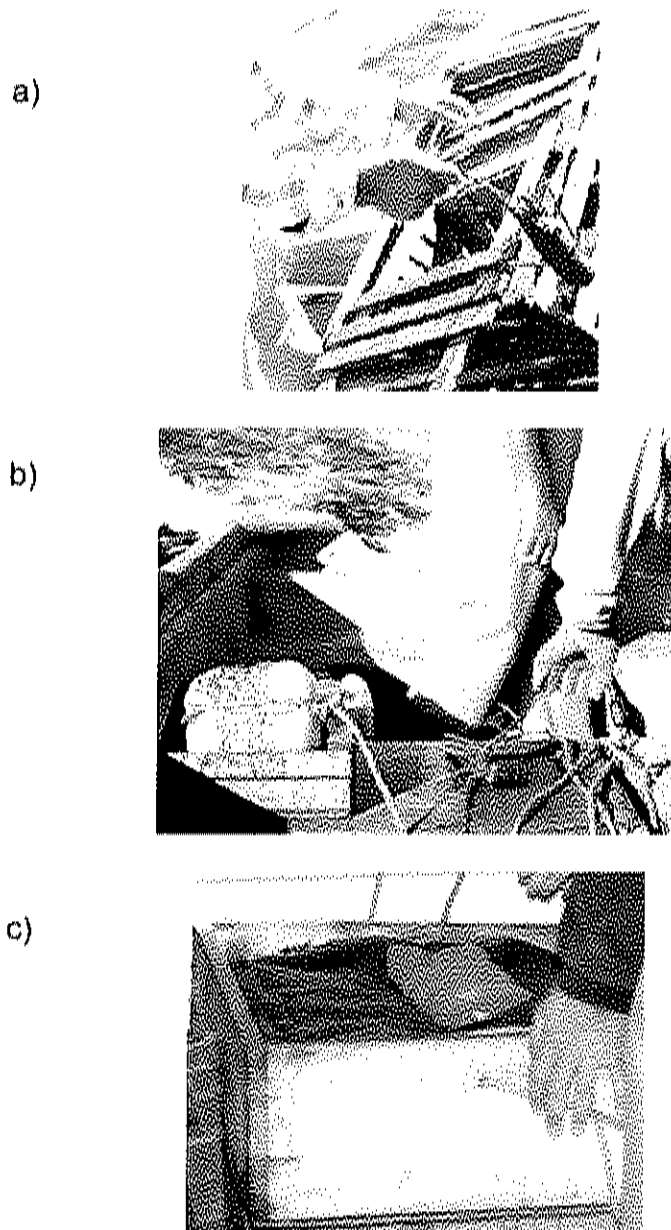


Figura 3. Procedimientos de manejo en la comercialización de la langosta *Panulirus interruptus*. a) y b) captura y traslado a la costa, c) cajas de madera para el transporte vía terrestre.

sentido, no hay estudios en los que se hayan determinado los efectos que pueda tener la exposición aérea a dicha temperatura en la especie *Panulirus interruptus*. Por ello, en el presente trabajo, se plantea evaluar el efecto de la exposición aérea sobre el metabolismo de la langosta bajo temperaturas de verano.

El segundo punto de emersión que describiremos es el transporte vía terrestre. En este procedimiento se utilizan cajas de madera cubiertas con dos sacos de ixtle humedecidos en agua de mar, uno colocado en el fondo, donde posteriormente se acomodan los animales y otro saco en la superficie para cubrirlos. Particularmente en la cooperativa donde se obtuvieron los animales utilizados en el presente trabajo, adicional al procedimiento anterior, utilizan geles de congelación sobre los sacos de ixtle para disminuir la temperatura de los animales. Sin embargo, el uso de las bolsas de congelación no es un procedimiento general de las cooperativas. Este procedimiento descrito, es el que se utilizara para la realización de los bioensayos del presente trabajo, con el fin de aplicar las técnicas que utilizan en forma común los pescadores.

Por otra parte, en trabajos previos, se determino la temperatura de 7°C como la temperatura mínima crítica de *Panulirus interruptus*. (Verdugo-Salazar 2002). Es decir, 7 ° C es la temperatura mas baja que se puede utilizar en el manejo de la langosta, sin que esta provoque daño en el animal, y por tanto se considera como una temperatura ideal de manejo de la especie. Sin embargo,

se debe dejar en claro que esta temperatura no es manejada dentro de los procedimientos de las cooperativas y se utiliza como referencia para evaluar el efecto de la utilización de temperaturas mas altas en el manejo de los animales.

En resumen, el objetivo del presente estudio fue el determinar los efectos de emersión de corta duración en diversos metabolitos de la langosta *Panulirus interruptus* en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas, observando la temperatura de exposición como una variable crítica en el manejo en vivo de la especie.

1.4 BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, M.Y., Gonzalez, J.G. y Espinoza, G. 1988. Biología y pesca de la langosta en el Pacífico mexicano. Los recursos pesqueros masivos de México. INP. SEPESCA. XXV Aniversario. 251-286.
- Briones, P. y Lozano, E. 1994. Chapter 10: The spiny lobster fisheries in Mexico. *Spiny lobster Management* (Eds. Phillips, B. F., Cobb S. S. y Kihaka, J.) Fishing News Books. Blackwell Scientific Publications.
- FAO. 2002. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/>
- Gomez-Jimenez, S. 1998. Some physiological and immunological responses of the spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall 1840) to practices used in it's live marketing in the Baja California Fishery. Ph.D Thesis. University of Hull. England.
- Gomez - Jimenez, S., Uglow, R. F. y Gollas-Galvan, T. 2000. The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Fish Shell. Immunol.* **10**, 631-635.
- Gomez-Jimenez, S., Uglow, R. F., Pacheco-Aguilar, R. y Noriega-Orozco, L. A. 2001. The application of HACCP principles and the results of physiological studies as a means of improving marketing practices for live crustaceans. In; *Live Aquatic Products*. (Eds. B. Paust and A. Rice). University of Alaska Sea Grant, Ak-sg-01-03/Facrbanks.
- Gomez-Jimenez, S. y Rodriguez, G. 2001. Benefit Sought and attitudes toward shellfish by Spanish and British consumers. *J. International Food and Agribusiness marketing.* **12** (3), 53-67.
- Greenaway, P. 1998. Physiological diversity and the colonization of land. Proceeding. Abstracts Fourth International Crustacean Congress. Amsterdam Holland.
- NOAA. 2000. National Oceanic and Atmospheric Administration. www.noaa.gov.

- O'Mahoney, M.P. y Full, R. J. 1984. Respiration of crabs in air and water. *Comp. Bioch. Physiol. A.* **79(2)**, 275-282.
- Phillips, B. F. Cobb, S.S. y Kihaka, J. 1994. Spiny lobster Manegament. *Fishing New Books*. (Eds. Phillips, B. F., Cobb, S. S; y Kihka, J.). Blackwell Scientific Publications.
- Rodriguez-Almaraz, G. y Campos, E. 1994. Distribution and status of the Crayfish (Cambaridae) of Nuevo León México. *J. Crust. Biol.* **14 (4)**, 729-735.
- Schmitt, A. S. C. 1995. Aspect of the physiology of some crustacean species with particular reference to their live marketing. Ph. D. Thesis. University of Hull. England.
- Semarnap. 2001. Secretaría De Marina Recursos Naturales y Pesca. www.semarnap.mx
- Spicer, J. I., Hill, A. D., Taylor, A. C. y Strang, R.H.C. 1990. Effect of aerial exposure on concentrations of selected metabolites in blood of the Norwegian lobster *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Nephropidae). *Mar. Biol.* **105**, 129-135.
- Vega-Velásquez, A., Espinoza Castro, G. y Gómez Rojo, C. 1996. Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. Eds. Casas Valdez, M. y Ponce Díaz G.
- Whiteley, N. M. y Taylor, E. W. 1992. Oxygen Acid-base disturbances in the hemolymph of the lobster *Homarus gammarus* during commercial transport and storage. *J. Crust. Biol.* **12 (1)**, 19-30.

**CAPITULO 2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AÉREA SOBRE ALGUNOS
METABOLITOS EN LA HEMOLINFA DE LA LANGOSTA ROJA *Panulirus*
interruptus.**

2.1. INTRODUCCIÓN

La exposición aérea de especies de crustáceos afecta los mecanismos del animal a nivel fisiológico y metabólico. Dependiendo del hábital (acuático, intermareal semiterrestre o terrestre) las adaptaciones fisiológicas pueden llevarlos a mantener su homeostasis por mayor o menor tiempo fuera del agua. El estudio integral de la respuesta a la exposición aérea es complejo; sin embargo, se puede realizar la evaluación de algún sistema fisiológico, relacionando las variables adecuadas. Entre dichos sistemas se encuentran la respiración, excreción, balance ácido - base y el metabolismo energético. En particular en este capítulo se analiza el metabolismo anaerobio y balance ácido - base (específicamente balance iónico)

2.1.1. Efecto de la exposición aérea sobre el metabolismo energético de crustáceos.

Bajo condiciones normales de oxígeno, alimento, temperatura, salinidad y nivel de actividad física, la mayoría de los organismos mantienen el suministro energético a los diferentes tejidos a través del metabolismo aeróbico. En dichas condiciones el metabolismo anaerobio es sólo una fracción mínima para la obtención de energía. A pesar de ello, en algunos organismos como los moluscos y crustáceos este metabolismo puede ser, en determinado momento,

la vía principal de obtención de energía. Esto sucede cuando el animal no es capaz de suministrar oxígeno suficiente a los diferentes tejidos, ya sea por actividad física intensa, por exposición a bajas concentraciones de oxígeno en agua (hipoxia) o por exposición aérea (Whiters, 1992).

El metabolismo anaerobio de los crustáceos decápodos ha sido evaluado por diversos autores por medio del monitoreo de lactato, metabolito final de esta vía metabólica (Spicer y col., 1990; Morris y col., 1995; Butler y Morris, 1996; Gomez-Jimenez, 1998; Chen y Chen, 1998).

Los organismos que tienen mejor adaptación a la exposición aérea mantienen un suministro adecuado de oxígeno a los diversos tejidos para el mantenimiento de la vía aeróbica. Por lo tanto, no registran aumento en la concentración de lactato en hemolinfa. En dicho caso se encuentran las especies *Hemigrapsus nudus* y *Leptograpsus variegatus* (Morris y col., 1995; Butler y Morris, 1996).

Por el contrario, cuando el animal no es capaz de mantener el suministro de oxígeno, la concentración de lactato en hemolinfa aumenta hasta 10 veces en las primeras horas de exposición aérea. Este es el caso de *Nephrops norvegicus* (Spicer y col., 1990) y *Peneaus japonicus* (Chen y Chen, 1998).

Recapitulando, la vía metabólica por la cual los crustáceos expuestos al aire obtienen su energía, depende de su capacidad para captar el oxígeno del aire y mantener activo el metabolismo aeróbico para la producción de ATP.

Cuando dicha capacidad no es suficiente, el animal utiliza la ruta anaerobia, siendo lactato el principal producto final.

2.1.2. Regulación del balance ácido - base

El balance ácido - base está relacionado con la regulación de los metabolitos asociados a la respiración (O_2 , CO_2), así como a la regulación del flujo de iones, productos finales del metabolismo del nitrógeno (NH_3 , NH_4^+) y de otros metabolitos (H^+). Todos estos procesos son separados y varían en forma independiente, sin dejar de estar interrelacionados (Randall y col., 1997).

La importancia bioquímica y fisiológica del balance ácido - base en crustáceos radica en el mantenimiento del equilibrio intracelular (células de los diferentes tejidos) y extracelular (hemolinfa). Esto se relaciona principalmente al mantenimiento del pH en un rango que le permita al animal mantener sus funciones biológicas y metabólicas. En el balance intracelular, un desequilibrio en el pH puede afectar la actividad enzimática de proteínas y en el fluido extracelular la función de proteínas respiratorias (Wheatly y Henry, 1992; Randall y col., 1997).

La regulación del pH extracelular se da por 4 mecanismos: 1) sistema buffer de protones orgánicos/inorgánicos, 2) por control de la presión parcial de

CO₂ 3) sistema mineral buffer del exoesqueleto, 4) intercambio de equivalentes ácido/base entre compartimentos intra - extracelulares (Wheatly y Henry, 1992).

Los órganos involucrados en la regulación del balance ácido - base en crustáceos son: branquias, glándula de la antena y en menor medida la cutícula exterior e intestino. Las branquias son el sitio de regulación de iones monovalentes (Lucu, 1990; Pequeux, 1995). Towle, (1993) analizó los mecanismos de transporte iónico a través de vesículas aisladas de células epiteliales de branquias de crustáceos. Como resultado presenta un modelo de mecanismos de intercambio catiónico o aniónico en la membrana celular incluyendo Na⁺/K⁺, Ca⁺⁺/Na⁺, Ca⁺⁺/H⁺, Cl⁻/HCO₃⁻, Na⁺/H⁺ y la libre salida de cloro (Fig. 4).

Por su parte la glándula de la antena regula los iones divalentes (Mg⁺⁺, Ca⁺⁺), así como otros solutos orgánicos e inorgánicos y el volumen de fluidos corporales. El intestino, aun cuando su principal función está relacionada a la absorción de nutrientes, también se ha relacionado a movimiento de iones y agua (Lucu, 1990; Pequeux, 1995).

Algunos factores que pueden alterar el balance ácido - base en los crustáceos son: la temperatura (Wood y Cameron, 1985); ejercicio (Booth y col., 1984); hipoxia (Morris y Callaghan, 1998) y cambio en la salinidad del medio ambiente (Zander, 1976; Young, 1978; Whiteley y col., 2001). Así como también

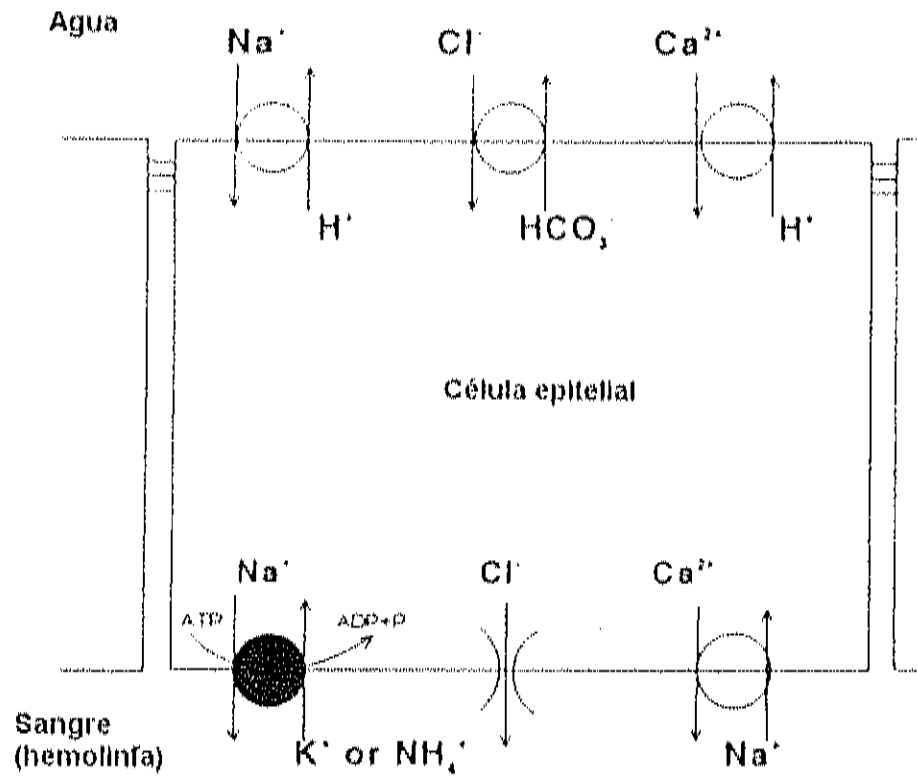


Figura 4. Modelo de los mecanismos de transporte iónico en células epiteliales de branquias de cangrejos. Resultado de estudios con membranas vesiculares aisladas (Towle, 1993).

el proceso de muda (Magnum y col., 1985; Towle y Magnum, 1985), la deshidratación (Wood y col., 1986) y el efecto de emersión (Whiteley y Taylor, 1992; Morris y col., 1995; Wheatly y col., 1996).

Hay muy pocos experimentos de emersión enfocados a estudiar el balance ácido - base y mas específicamente el balance iónico. En forma general los desequilibrios se asocian a la inhabilidad de las branquias en realizar sus funciones de intercambio gaseoso, iónico y de excreción ante la falta del medio acuático (De Fur y col., 1988). Por ello, en los crustáceos decápodos se establecen mecanismos intra y extracelulares para el mantenimiento del balance iónico, en un rango que les permita sobrevivir a la exposición aérea (Taylor y Butler, 1978; Weatly y Henry, 1992; Morris y col., 1995).

Bajo la perspectiva anterior, este trabajo, se enfoca a estudiar efectos de emersión, sobre algunos metabolitos asociados al balance iónico y metabolismo energético. La finalidad es que el conocimiento de estos sistemas de regulación, se puede aplicar a especies que son expuestas a emersión durante los procedimientos post-captura y comercialización.

En específico, la especie *Panulirus interruptus*, es capturada y comercializada en la Península de Baja California, México. Esta especie se expone a diferentes periodos de emersión durante la captura, desembarque, clasificación y traslado final (Gomez-Jimenez y col., 2001). En estudios

preliminares, se determinó que esta especie puede sobrevivir a períodos de emersión de larga duración (50 h) en alta humedad relativa (96-98), sin embargo falta información sobre el balance iónico en la hemolinfa durante períodos de emersión.

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de emersión la especie *Panulirus interruptus*, sobre metabolitos en hemolinfa, relacionado específicamente con metabolismo energético asociando la concentración de iones y el valor de pH, esto bajo dos temperaturas de exposición 7 °C y 20 °C.

2.2. MATERIALES Y METODOS

2.2.1. Captura y Mantenimiento de los Animales

Se utilizaron 90 langostas de la especie *Panulirus interruptus* con un peso promedio de 607.5 ± 11.9 g, capturadas en la zona central de la Península de Baja California, en Punta Abreojos. Los animales fueron trasladados al laboratorio del CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste) en la ciudad de La Paz, B. C. S., siguiendo el procedimiento utilizado por las cooperativas. Se utilizaron cajas de madera, las cuales se cubrieron con un saco de ixtle humedecido con agua de mar. Se colocó a los animales sobre el saco y fueron cubiertos con un segundo saco humedecido. Finalmente se colocaron sobre los sacos, geles de congelación para el mantenimiento de bajas temperaturas.

En las instalaciones del CIBNOR, los animales se colocaron en recipientes de 800 L de fibra de vidrio (35 animales por recipiente) o bien en recipientes individuales plásticos (40 L). Se realizaron recambios diarios del 100% del volumen, utilizando agua de mar filtrada (36 ppm y 20°C). Durante el tiempo de mantenimiento de una semana, los animales fueron alimentados *ad libitum* con calamar, dejando de suministrarles comida 48 h previas a cada uno de los experimentos.

2.2.2 Experimento de exposición aérea a 7 °C y 20 °C.

Se utilizaron 70 animales sin ningún daño físico aparente con un peso promedio de 607.5 ± 11.9 g. Para cada temperatura, 7 °C y 20 °C, se subdividieron 35 animales en 5 grupos de 7 individuos cada uno. El primer grupo de cada temperatura se utilizó como control, este grupo siempre se mantuvo inmerso en agua de mar. Los restantes 4 grupos fueron expuestos al aire colocados en recipientes plásticos, cubiertos por sacos de ixtle humedecidos en agua de mar, esto dentro de una cámara con humedad relativa de 93 ± 0.4 %. Después de transcurrir 1 hora, se tomaron los animales del segundo grupo en cada condición y se les extrajo aproximadamente 10 ml. de hemolinfa. Este último procedimiento se llevó a cabo a las 4, 7 y 10 h con los grupos tercero, cuarto y quinto en cada condición.

2.2.3. Reinmersión de los animales por 2 horas.

Dos grupos de 7 animales cada uno, en cada una de las temperaturas (7 °C y 20 °C) se expusieron al aire por 10 h bajo las mismas condiciones de los experimentos de emersión descritos anteriormente. Al término de este tiempo de exposición aérea, los animales fueron colocados en acuarios individuales,

con un volumen medido de agua de mar filtrada (16 L). Después de 2 horas, los animales se pesaron, se extrajo la muestra de hemolinfa, estas se congelaron y almacenaron a -80°C .

2.2.4. Obtención de hemolinfa.

Las muestras de hemolinfa se extrajeron con jeringa de 5 mL, en la base del cuarto o quinto pleópodo del animal (Fig. 5). Por medio de dos extracciones se obtuvieron de 8 a 10 mL de muestra, las cuales se colocaron en tubos de poliestireno de 10 mL. Solamente las muestras para análisis de lactato, debido a los procedimientos de la misma se colocaron en tubos eppendorf de 1.7 mL, conteniendo ácido perclórico en relación 1:1 a la muestra de hemolinfa (0.6 mL). Todas las muestras hemolinfa, se congelaron a -80°C . Después se trasladaron a las instalaciones de CIAD, A. C., en Hermosillo, donde finalmente se congelaron a -30°C , manteniéndose bajo dicha temperatura hasta su análisis en el laboratorio de fisiología de invertebrados.

2.2.5. Determinación de Lactato.

Se determinó lactato por medio de juego de reactivos enzimáticos (Sigma

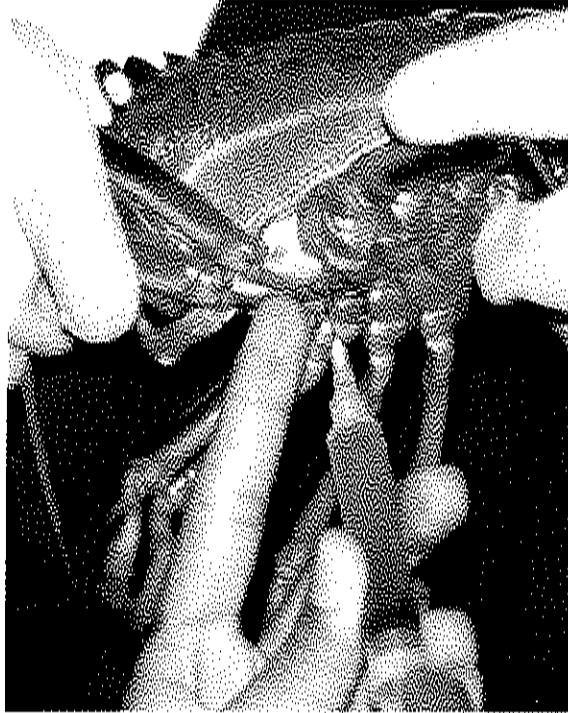


Figura. 5. Toma de muestras de la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus*, durante el experimento de emersión.

Lactate procedure No. 735) siguiendo los pasos recomendados por el fabricante, con la modificación para cuantificación en microplacas, la cual se describe a continuación.

La muestra de 0.6 mL de hemolinfa se recolectó en tubos eppendorf de 1.7 mL conteniendo ácido perclórico al 6% en relación 1:1 al volumen de hemolinfa. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 2000 g por 5 min. a 4 °C en una centrífuga Beckman 65-15. El sobrenadante se neutralizó con 20% de su volumen con K_2CO_3 2.5 M. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 2000 g por 5 min. para eliminar el precipitado que se formó al adicionar K_2CO_3 . De este último sobrenadante se tomaron 10 μ L de muestra y se colocaron en microplaca de 96 pozos (por triplicado). Posteriormente se adicionaron 200 μ L de lactato rehidratado a cada pozo. En la misma placa se colocaron la solución estándar y el blanco. Se incubó la placa de 5-10 min. a temperatura ambiente, para finalmente leerse a una longitud de 540 nm en un lector de ELISA.

La concentración final de lactato en hemolinfa se calculó y reportó como $mmol.L^{-1}$.

2.2.6. Determinación de pH

La determinación de pH se realizó utilizando un potenciómetro Corning Modelo M240 (Ciba Corning Diagnostics Ltd, Sudbury , England). La muestra de

hemolinfa se descongeló, se tomaron 2 mL y se realizó la medición del pH, utilizando estándares Sigma de pH 7 para la calibración del equipo.

2.2.7. Determinación de presión osmótica

La determinación de la presión osmótica se realizó en un osmómetro de vapor marca Wescor 550. Se utilizaron 10 μL de hemolinfa para la medición. Los resultados se registraron en mmol.kg^{-1} .

2.2.8. Determinación de iones.

El análisis de los iones Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+ se realizó por espectrofotometría de flama en un Spect AA-20 (Varian Mulgrave, Victoria, Australia) a una longitud de 422 nm para Ca^{++} , 285 nm para Mg^{++} , 589 nm para Na^+ y 766.5 nm para K^+ . Debido a las interferencias que se presentaron al momento de estandarizar las técnicas, los iones fueron digeridos y analizados en dos grupos.

Para los iones Ca^{++} y Mg^{++} , la digestión de la muestra se hizo de la siguiente manera: se colocaron 100 μL de muestra de hemolinfa en vasos de digestión lineal, a los cuales se les adicionó 5 mL de HNO_3 al 50% (v/v). Después los vasos se colocaron en horno de microondas CEM modelo MDS-81D (CEM Corporation, Matthews, NC), programándose la primera etapa de

digestión (Tabla 1). Al final del ciclo, los vasos se colocaron en una campana de extracción y se dejaron enfriar para liberar la presión interna. Una vez fríos los vasos, se le adicionaron 3 mL de H_2O_2 al 30 % (v/v) y nuevamente se colocaron en el horno de microondas, programándose la segunda etapa (Tabla 1). Al final los vasos se dejaron enfriar para liberar la presión interna. Debido a que estos iones sufren de interferencias químicas al momento de realizar la medición en flamas de aire - acetileno, se utilizó una solución de cloruro de lantano (LaCl_3) 7.2 mmol.L^{-1} para suprimir dichas interferencias. Así las soluciones obtenidas después de los dos ciclos de digestión fueron transferidas a matraces volumétricos clase A de 50 mL, aforándose con la solución de LaCl_3 antes mencionada.

Para los iones Na^+ y K^+ , la digestión se realizó de la siguiente manera 100 μL de muestra de hemolinfa se colocaron en vasos de digestión lineal, se adicionaron 5 mL de H_2NO_3 al 50 % (v/v, se colocaron en el horno de microondas, programando la primera etapa de digestión (Tabla 1). Debido a que el H_2O_2 al momento de estandarizar la técnica afectó la estabilidad de las lecturas, se decidió utilizar solo la primera etapa de digestión. Al igual que los iones anteriores, Na^+ y K^+ sufren de interferencias por ionización al momento de la lectura, las cuales se suprimen al adicionar litio a las soluciones obtenidas en la digestión. Las muestras digeridas se transfirieron y se aforaron en matraces clase A de 50 mL con una solución de LiCl 0,216 M.

Tabla 1. Etapas de digestión para la determinación de los iones Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ y K^+ , indicando el tiempo y poder del equipo utilizados.

| Primera etapa | | | Segunda etapa | | |
|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|
| Poder (%) | Tiempo (min) | Presión (psi) | Poder (%) | Tiempo (min) | Presión (psi) |
| 100 | 4 | 90 | 100 | 4 | 90 |
| 95 | 5 | 90 | 90 | 10 | 90 |
| 85 | 10 | 90 | 0 | 0 | |
| 0 | 5 | | | | |

Para cada elemento se utilizó una curva de calibración estándar, igualando matrices por la adición de 0.5 mL de H_2NO_3 al 50 % (v/v), aforando con la solución de LaCl_3 para Ca^{++} y Mg^{++} y con la solución de LiCl para Na^+ y K^+ . La concentración de cada ión en las muestras se determinó por la relación:

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{lectura del instrumento})(\text{Vol. afore muestra mL})}{(\text{volumen de muestra mL})}$$

Se registró al final la concentración de cada ión en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ppm).

2.2.9. Análisis Estadísticos

El análisis estadístico, fue realizado utilizando análisis de varianza de efectos fijos para un diseño factorial. El efecto principal A, fue temperatura con dos niveles y el efecto principal B, fue el tiempo de exposición aérea con 6 niveles. Para determinar si la diferencia entre alguno de los factores era significativa, se realizó la prueba de intervalos de Tukey con nivel de confiabilidad del (0.05).

2.3. RESULTADOS

2.3.1 Descripción de variables.

La exposición aérea indujo una variación significativa ($p < 0.05$) en la concentración de lactato, pH y en los iones Mg^{++} y Na^+ dependiendo de temperatura y tiempo de exposición. Por el contrario los iones Ca^{++} , K^+ y la presión osmótica no se vieron afectados ($p \geq 0.05$).

La concentración de lactato (Fig. 6) se vio afectada por temperatura ($p < 0.05$), siendo mayor a 20 °C en comparación con 7 °C. La concentración inicial (C) de lactato a 7 °C fue de $0.31 \pm 0.06 \text{ mmol.L}^{-1}$ aumentando en el tiempo de emersión, con un valor máximo de $1.31 \pm 0.2 \text{ mmol.L}^{-1}$ entre 4 y 7 h. A pesar del aumento mencionado al final de las 10 h de emersión, se registró disminución de lactato hasta $0.85 \pm 0.27 \text{ mmol.L}^{-1}$. Esto último es más fácil determinarlo por medio de la tasa de acumulación de lactato, que a 4 y 7 h fue de $0.31 \text{ mmol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ disminuyendo a $0.20 \text{ mmol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a las 10 h de emersión. En el tiempo de reinmersión (Re) la concentración de lactato aumentó en forma significativa ($p < 0.05$) a $1.67 \pm 0.24 \text{ mmol.L}^{-1}$, presentando el valor máximo de lactato a 7 °C.

En el experimento a 20 °C se observó un aumento progresivo en la concentración de lactato entre las 7 y 10 h. La concentración inicial fue de

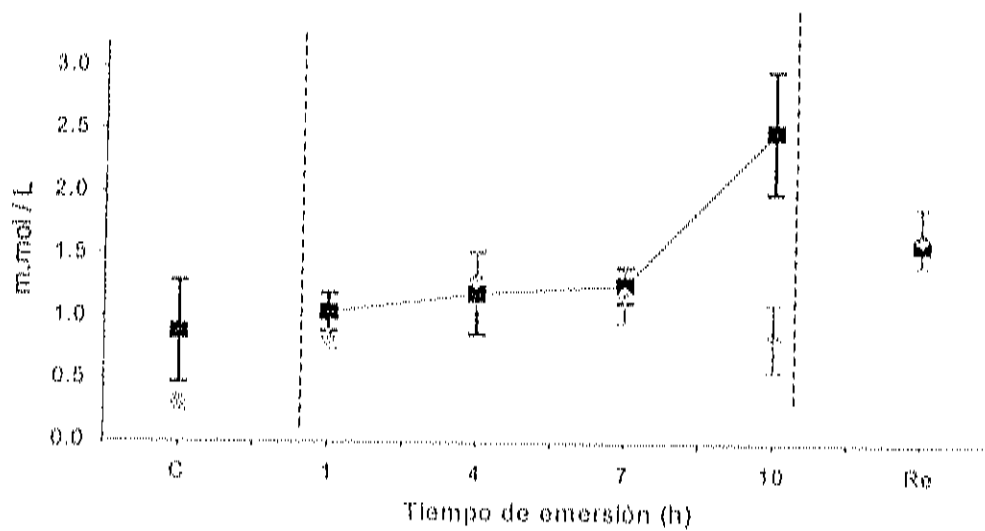


Figura 6. Variación de lactato en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◇) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (◇) y 20°C (■).

$0.8 \pm 0.4 \text{ mmol.L}^{-1}$ aumentando hasta $2.5 \pm 0.5 \text{ mmol.L}^{-1}$ a las 10 h de emersión. Este aumento también se determinó por la velocidad de acumulación de lactato, con un aumento de $0.3 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ durante 4 y 7 h de emersión hasta $0.6 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en 10 h de emersión. Después de 2 h de reinmersión, la concentración de lactato en la hemolinfa de los animales disminuyó ($p < 0.05$) hasta $1.6 \pm 0.3 \text{ mmol.L}^{-1}$.

El pH (Fig. 7) en la hemolinfa no registró variación por efecto de temperatura. Además, a 7°C tampoco se registró variación por tiempo de exposición, manteniendo un rango de 7.2 ± 0.05 a 7.3 ± 0.03 . Sin embargo, en el caso de la exposición a 20°C sí se registró una disminución progresiva del pH ($p < 0.05$) en las 10 h de emersión en las cuales decayó de 7.6 ± 0.02 a 7.1 ± 0.05 . En el tiempo de reinmersión el valor de pH aumentó a 7.4 ± 0.05 ($p < 0.05$).

El efecto de la emersión en la concentración de iones en la hemolinfa de la especie *P. interruptus*, fue diverso. Los iones Mg^{++} y Na^+ registraron variación significativa ($p < 0.05$) por efecto de alguno de los factores temperatura o tiempo de exposición, mientras que los iones Ca^{++} y K^+ no variaron.

La temperatura afectó la concentración de el ión Mg^{++} (Fig. 8) en la hemolinfa induciendo valores menores a 7°C en comparación a 20°C ($p < 0.05$). Sin embargo el tiempo de exposición no afectó a este ión, ni a 7°C ni a 20°C

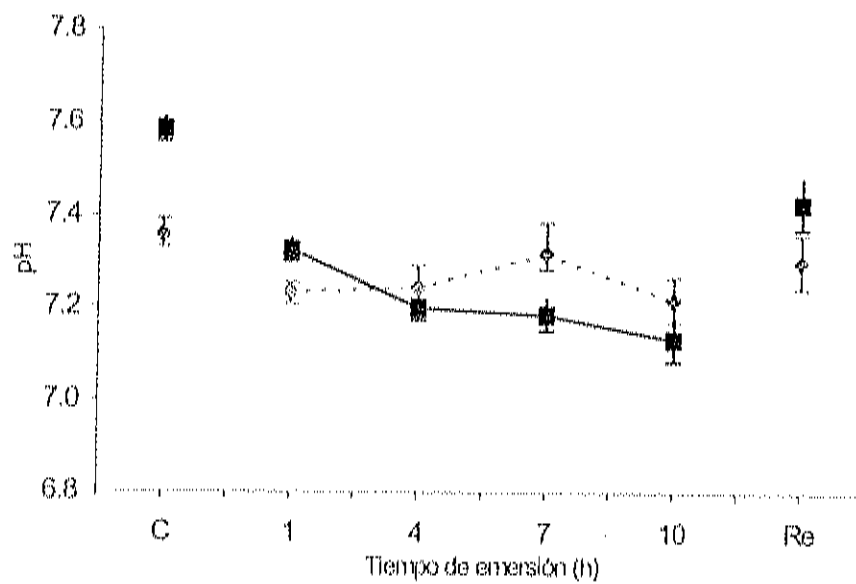


Figura 7. Variación del pH de la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◇) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (◇) y 20°C (■).

($p \geq 0.05$) El rango de concentración de Mg^{++} a 7 °C fue de $237.8 \pm 15.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $278.7 \pm 5.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ En el caso de la exposición a 20 °C, la variación fue entre $154.3 \pm 5.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $215 \pm 39.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

El ion Na^+ (Fig. 9) disminuyó por efecto del tiempo de emersión en ambos experimentos (7 °C y 20 °C). En el experimento a 7 °C se observó una disminución progresiva y significativa ($p < 0.05$) desde $8241.0 \pm 600.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el grupo control hasta $6125.0 \pm 534.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a las 10 h de emersión. Dicha disminución también se observó en los animales colocados en reinmersión por 2 h, llegando hasta $5553.6 \pm 186.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En el experimento a 20°C, el ión Na^+ aumentó de $4910.7 \pm 405.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el control hasta $6424.1 \pm 478 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ después de una hora de emersión. Posteriormente a las 10 h, se observó una disminución a $4192 \pm 148 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ cercana a la concentración del control. De igual manera, la concentración de este ión en la hemolinfa de las langostas colocadas 2 h en reinmersión fue cercano a la del control con $4348.2 \pm 354.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

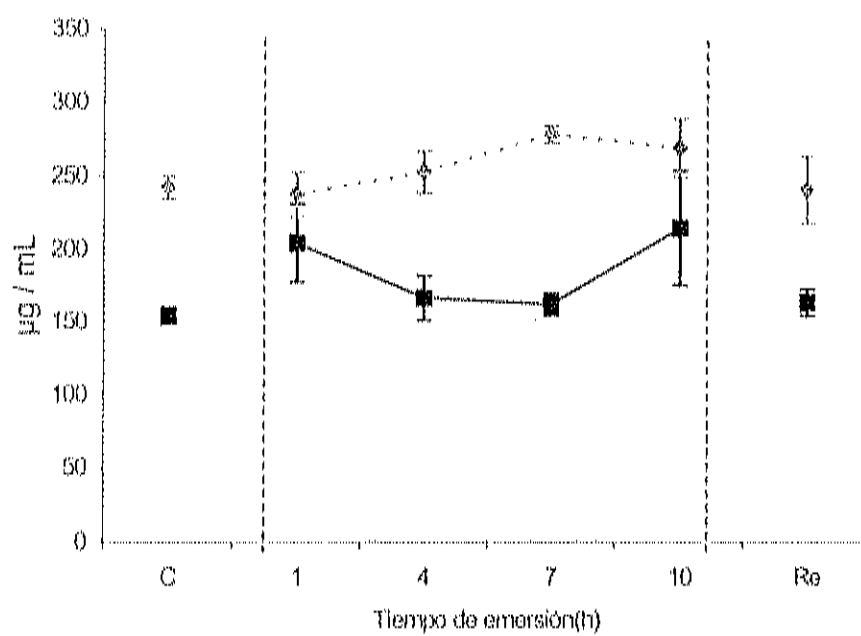


Figura 8. Concentración de Mg²⁺ en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◇) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (◇) y 20°C (■).

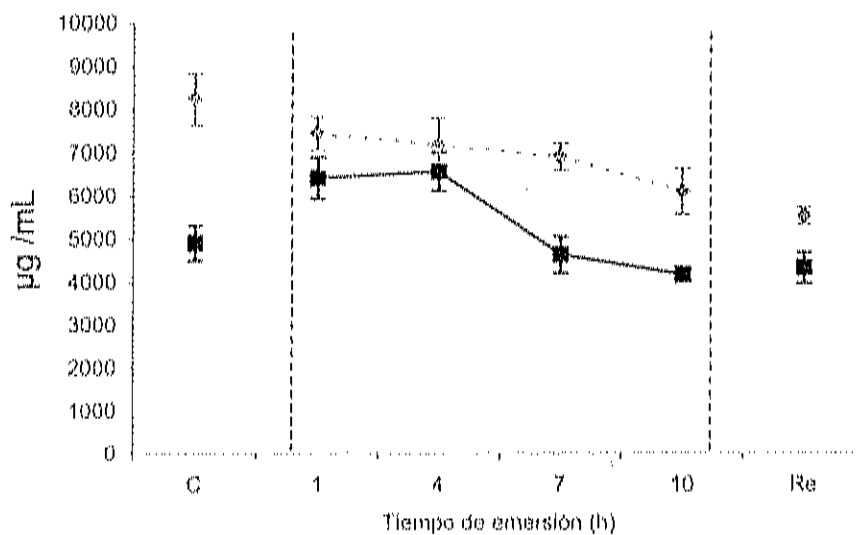


Figura 9. Concentración de Na⁺ en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◇) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (◇) y 20°C (■).

La concentración de los iones Ca^{++} y K^+ y la presión osmótica en la hemolinfa, no registraron diferencias significativas por efecto de la temperatura, tiempo de emersión o interacción de los factores ($p \geq 0.05$). Por ello, solamente se describen sus rangos de concentración.

La concentración de el ión calcio en la hemolinfa (Fig. 10) presentó un rango de $631 \pm 64.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $704.9 \pm 70.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ durante la exposición aérea a 7°C . En el caso del experimento a 20°C el rango fue de $523.0 \pm 49\mu\text{g.mL}^{-1}$ y $710.5 \pm 138.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A 7°C , el ión K^+ (Fig. 11) presentó un rango de concentración de $284.8 \pm 73.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $350.7 \pm 59.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A 20°C , la variación fue entre $295.7 \pm 23.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y $399.2 \pm 23.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Finalmente, el rango de variación de la presión osmótica (Fig. 12) a temperatura de exposición de 7°C fue de $1100.7 \text{ mmol.kg}^{-1} \pm 21.8$ a $1132 \text{ mmol.kg}^{-1} \pm 16.8$. A 20°C , la variación fue entre $1069.4 \text{ mmol.kg}^{-1} \pm 22.2$ y $1148.9 \text{ mmol.kg}^{-1} \pm 45.5$.

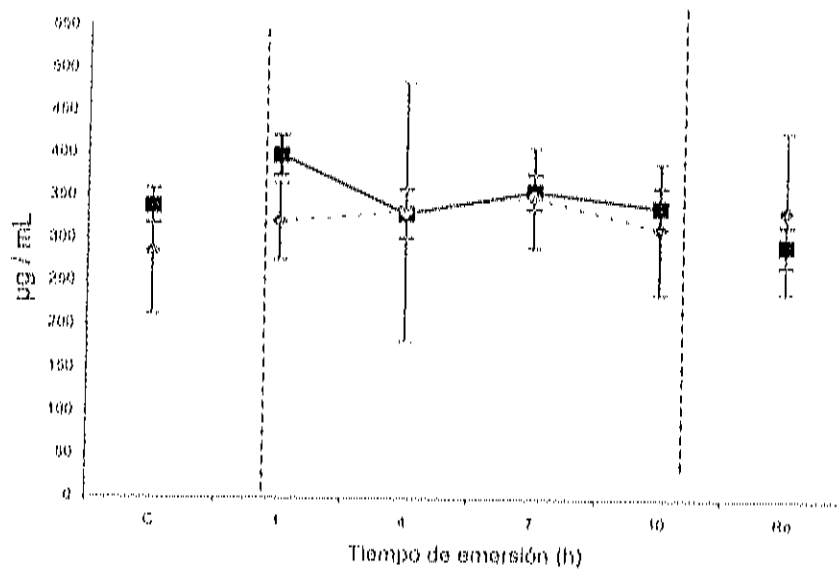


Figura 11. Concentración de K^+ en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (\diamond) y 20°C (\blacksquare), (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (\diamond) y 20°C . (\blacksquare).

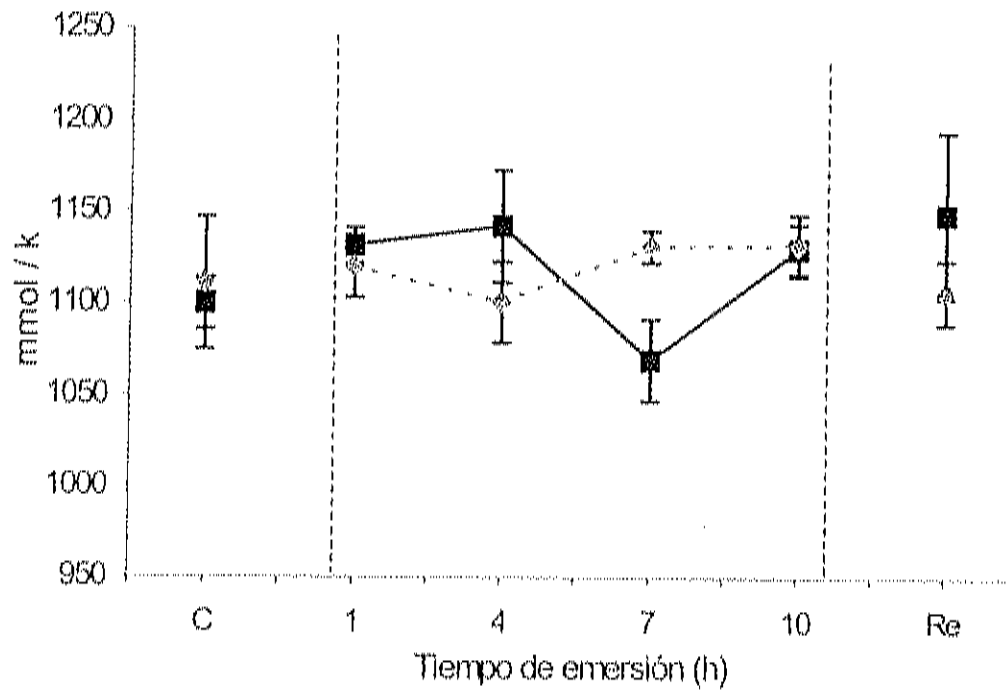


Figura 12. Variación de la presión osmótica en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◇) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (◇) y 20°C, (■).

2.4. DISCUSION

La vía por la cual los crustáceos expuestos al aire obtienen su energía, depende de su capacidad para captar el oxígeno del aire y mantener activo el metabolismo aeróbico para la producción de ATP. Cuando esta capacidad no es suficiente, el animal utiliza la ruta anaerobia, siendo lactato el producto final. Así lo han demostrado varios autores en estudios con crustáceos. Spicer y col., (1990), registró en la especie *Nephrops norvegicus* un aumento 10 veces mayor a la concentración inicial después de 12 h de emersión a 10 °C. Por esto se considera que dicha especie no tiene capacidad para captar oxígeno al ser expuesta al aire.

Por lo contrario, *Carcinus maenas* (15 °C), *Hemigrapsus nudus* (10 °C y 25 °C), *Procambarus clarkii* (23°C) y *Leptograpsus variegatus* (22°C) presentaron valores menores a 1 mmol.L⁻¹ después de 12 h de exposición aérea. Esto muestra que dichas especies pueden regular la toma de oxígeno durante emersión (Taylor y Butler, 1978; Morris y col., 1995; Wheatly y col., 1996; Butler y Morris, 1996).

El efecto sobre la concentración de lactato no solo depende del tiempo de emersión, sino también de la temperatura. De cuerdo a los estudios de Chen

y Chen, (1998) con *Peneaus japonicus*, el aumento en la concentración de lactato tuvo una relación directa al incremento de la temperatura.

En este contexto, la langosta *Panulirus interruptus*, tiene cierta capacidad para captar el oxígeno del aire durante su exposición a emersión; capacidad que se ve afectada por la temperatura. Así a 20 °C la concentración de lactato aumentó en un 52 %, con respecto a lo que se registró a 7 °C. Es decir, el aumento en la temperatura de exposición aérea aceleró la acumulación de lactato.

En emersión a 7 °C la especie mostró la capacidad fisiológica necesaria para el mantenimiento de la vía aeróbica. Esto se evidenció porque produjo muy poco lactato con el valor máximo cercano a 1 mmol.L⁻¹, a las 10 h de emersión. Esto concuerda con lo determinado por Gomez-Jimenez, (1998), quien encontró, a la misma temperatura valores menores a 1 mmol.L⁻¹ a las 12 h de emersión en la misma especie.

La baja concentración de lactato registrada a 7 °C, puede explicarse bajo dos razones. La primera es que la langosta a esta temperatura no requiere la vía anaerobia para el suministro de energía debido a una probable toma de oxígeno en el aire. La segunda, es que debido precisamente a la baja temperatura de exposición, el metabolismo se reduce. Para demostrar la primera de ellas, habría que realizar estudios mas detallados acerca de las variables asociadas a la respiración, para determinar si la velocidad de

captación de oxígeno permanece constante o disminuye. Por otra parte, la utilización de bajas temperaturas es un procedimiento normal dentro del manejo en vivo de crustáceos acuáticos para disminuir la velocidad del metabolismo y mantener durante más tiempo a los animales en buenas condiciones (Morris y Oliver, 1999).

En la exposición aérea a 20 °C, en las primeras horas de emersión no aumentó la concentración de lactato. Sin embargo en el período entre 7 y 10 h aparentemente la langosta perdió la capacidad de regulación del metabolismo aeróbico, activando la vía anaerobia para la obtención de energía. Al final de las 10 h de emersión, la concentración de lactato fue de 2.5 mmol L⁻¹. Aun cuando el desequilibrio no provocó mortalidad al final del período de emersión, un porcentaje considerable (60 % por observación *in situ*), registró poca resistencia al manejo. El aumentar el tiempo de emersión a esta temperatura probablemente provoque en el animal una mayor dependencia de la vía anaerobia para la producción de energía y el desbalance ácido - base sea mas severo. Finalmente, se determinó que una reímersión de 2 h disminuye el valor de lactato circulante en hemolinfa, pero sin bajar hasta el nivel del control, sino doblándolo. Quizá se requiera de mas tiempo para la total recuperación del metabolismo energético.

Por otra parte en la langosta *Panulirus interruptus*, en primera instancia, el pH de la hemolinfa no varió por efecto de temperatura ante la exposición

aérea. Además a 7 °C no se determinó ningún desequilibrio, ya que el pH solo varió aproximadamente 0.14 unidades. Esto puede deberse a que los sistemas de regulación hayan sido eficientes en el mantenimiento del pH, o bien, que la exposición aérea a 7 °C durante 10 h no provocara desequilibrio en su metabolismo. Esto último se relaciona a los resultados encontrados para el metabolismo energético. En forma opuesta, los animales expuestos a 20 °C no tuvieron la misma capacidad de regulación. La disminución progresiva de pH llegó hasta 0.46 unidades.

La disminución del pH en la hemolinfa de los crustáceos expuestos al aire, puede ser debida a la acumulación de CO₂, y/o a la acumulación de lactato. Wheatly y Henry, (1992), en una revisión sobre la regulación ácido - base en crustáceos acuáticos, mencionan que al exponerlos al aire se presenta una mezcla de acidez respiratoria y metabólica con una disminución del pH extracelular. Así mismo, se da un incremento en la presión parcial de CO₂ y un incremento de lactato (Taylor y Wheally, 1981; Tyler-Jones y Taylor, 1988).

En el presente estudio, la acidez registrada durante la emersión a 20 °C, se puede asociar a la acumulación de lactato en hemolinfa. Sin embargo podría no ser está la única variable asociada, considerando los resultados obtenidos en lactato y en pH. Por una parte el lactato se disparó entre las 7 y 10 h de emersión, mientras que el pH disminuyó progresivamente desde la primera hora de emersión, con el valor mas bajo al final de las 10 h. Por tanto, si bien la

acumulación de lactato es un factor que favorece la disminución del pH, también podría estar asociado a una acumulación de CO₂, Esta última variable debería analizarse en un estudio posterior.

De Fur y col., (1980), evaluaron en la especie *Cancer productus* las variaciones en la concentración de Ca⁺⁺ en hemolinfa. Los autores encontraron un aumento del 40 % después de 4 h de emersión a 10 °C por lo que sugieren que la disminución de CaCO₃ del exoesqueleto fue un sistema eficiente para balancear el desequilibrio ocasionado durante la emersión. Posteriormente De Fur y MacMahon, (1983), discuten sobre la velocidad con la que esta regulación puede llevarse a cabo. Esto debido a las diferencias encontradas entre *Carcinus maenas* que toma entre 72-80 h (Truchot, 1975) y la especie *C. Productus*, en donde se presentó en menos de 8 h.

Finalmente, Morris y col., (1995) de la especie *Hemigrapsus nudus*, encontraron un ligero aumento de Ca⁺⁺ (8 mmol.L⁻¹) sin ser significativo el efecto de emersión o temperatura (10 y 25 °C) sobre este ión. Por ello se consideró que en esta especie, la disolución de CaCO₃ no es un sistema de regulación activo.

En la langosta *Panulirus interruptus*, no hay evidencia de disolución de CaCO₃, ya que no se registró un aumento significativo de Ca⁺⁺ durante el tiempo de emersión. Sin embargo, al final del tiempo de emersión a 20 °C, hubo un ligero aumento en la concentración de Ca⁺⁺ aun que no significativo,

probablemente porque esté enmascarado en los amplios rangos de variación. Por lo tanto, podría ser que la langosta utilice la disolución de CaCO_3 para realizar un ajuste en el pH en tiempos de emersión prolongados y el aumento detectado sea solo el inicio de la activación del mecanismo.

Otro de los iones importantes en la regulación del balance ácido-base es el Na^+ que se intercambia en membranas para la regulación iónica. Morris y col., (1995), estudiaron la exposición aérea de *Hemigrapsus nudus* registrando a 10 °C una disminución en la concentración de iones, mientras que a 25 °C la concentración aumentó. Los autores proponen que estas variaciones se deben a un secuestro de iones en la cámara branquial. Sin embargo, esto último depende del volumen que queda atrapado dentro de la cámara, al ser expuesto el animal a emersión. Por lo pequeño de esta cámara su contribución puede ser solo un factor, mientras que el intercambio intra-extracelular es el mecanismo principal.

Algunos autores sugieren que la regulación del balance ácido - base intra y extra celular puede estar sub - compartido en los crustáceos. Esto bajo la existencia de una pequeña "cámara" o espacio dentro del caparazón que puede ser capaz de regular su balance ácido - base e iónico en forma independiente, por medio de una membrana celular unidireccional (Wheatly y Henry, 1992).

Wood y Cameron, (1984) caracterizaron en la especie *Callinectes sapidus* el compartimiento mencionado, a una temperatura de 20 °C.

Encontraron que mientras el pH de la hemolinfa es de 7.8, el de esta cámara registró un valor de 8.2. Además, la cámara pareciera actuar como mecanismo de regulación por su concentración iónica. Así, la especie de camarón pelágico *Notostomus gibbosus* presenta una composición alta de NH_4^+ y baja de Na^+ , K^+ , Mg^{++} y Ca^{++} , en la mencionada cámara (Wheatly y Henry, 1992).

En resumen, la variación de Na^+ podría estar relacionada con ajustes intra-extracelulares, en la que puede haber algún elemento (tejido, o sub compartimiento) que actúe activamente en la regulación iónica.

En la especie *Panulirus interruptus*, ante la falta de los datos en la cámara branquial y el sub compartimiento del caparazón, se puede concluir que la regulación se llevó a cabo por intercambios intra - extracelulares.

En forma de conclusión, probablemente el animal en emersión a 7°C, disminuya su actividad metabólica y por medio de ello mantenga su homeostasis. Otra probabilidad es que la toma de oxígeno del aire sea eficiente para mantener su metabolismo en condiciones óptimas durante 10 h de emersión.

En contraste, en emersión a 20 °C la langosta *P. interruptus* sufre un "desequilibrio" en el periodo entre 7 y 10 h. Esto se evidencia por el aumento en la concentración de lactato y Ca^{++} y la disminución en Na^+ , Mg^{++} , pH y la presión osmótica. Es decir que para esta especie fue en dicho periodo donde sus sistemas de regulación y metabolismo aeróbico se afectaron e iniciaron los

Encontraron que mientras el pH de la hemolinfa es de 7.8, el de esta cámara registró un valor de 8.2. Además, la cámara pareciera actuar como mecanismo de regulación por su concentración iónica. Así, la especie de camarón pelágico *Notostomus gibbosus* presento una composición alta de NH_4^+ y baja de Na^+ , K^+ , Mg^{++} y Ca^{++} , en la mencionada cámara (Wheally y Henry, 1992).

En resumen, la variación de Na^+ podría estar relacionada con ajustes intra-extracelulares, en la que puede haber algún elemento (tejido, o sub compartimiento) que actúe activamente en la regulación iónica.

En la especie *Panulirus interruptus*, ante la falta de los datos en la cámara branquial y el sub compartimiento del caparazón, se puede concluir que la regulación se llevó a cabo por intercambios intra - extracelulares.

En forma de conclusión, probablemente el animal en emersión a 7°C, disminuya su actividad metabólica y por medio de ello mantenga su homeostasis. Otra probabilidad es que la toma de oxígeno del aire sea eficiente para mantener su metabolismo en condiciones óptimas durante 10 h de emersión.

En contraste, en emersión a 20 °C la langosta *P. interruptus* sufre un "desequilibrio" en el periodo entre 7 y 10 h. Esto se evidencia por el aumento en la concentración de lactato y Ca^{++} y la disminución en Na^+ , Mg^{++} , pH y la presión osmótica. Es decir que para esta especie fue en dicho periodo donde sus sistemas de regulación y metabolismo aeróbico se afectaron e iniciaron los

desajustes en su balance ácido – base. En ese sentido, podría especularse que un periodo de emersión a 20 °C menor a 7 h no alteraría en gran medida a el animal. Así mismo un periodo mayor inducirá el inicio de desequilibrios internos que quizá sean mas severos conforme transcurra el tiempo de emersión.

2.5. BIBLIOGRAFIA

- Booth, C., McMahon, P., De Fur, P. y Wilkes, H. 1984. Acid-base regulation during exercise and recovery in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Res. Physiol.* **58**, 359-376.
- Butler, L.S. y Morris, S. 1996. Haemolymph respiratory gas, acid-base, and ion status of the amphibious purple shore crab *Leptograpsus variegatus* (Fabricius) in response to air-breathing. *J. Crust. Biol.* **16**(2), 240-252.
- Chen, J. C. y Chen, J. S. 1998. Acid-base balance, ammonia and lactate level in the haemolymph of *Penaeus japonicus* during aerial exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* **121A**, 257-262.
- De Fur P. L. y McMachon B. R. 1984. Physiological compensation to short-term air exposure in red crabs, *Cancer productus* Randall, from littoral and sublittoral habitats. II Acid-base balance. *Physiol. Zool.* **57**(1) 151-160.
- De Fur L.P., Pease A., Siebelink A y Elfers S. 1988. Respiratory responses of blue crabs *Callinectes sapidus*, to emersion *Comp. Biochem. Physiol.* **89 A**, 97-101.
- De Fur P.L. Wilkes P.R:H. y McMahon B.R. 1980. Non-equilibrium acid-base in *C. productus*: role of exoskeletal carbonate buffers. *Resp Physiol.* **42**, 247-261.
- Gomez-Jimenez, S. 1998. Some physiological and immunological responses of the spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall 1840) to practices used in its live marketing in the Baja California. Ph.D Thesis. University of Hull. England.
- Gomez-Jimenez S., Uglow R. F., Pacheco Aguilar R. y Noriega-Orozco L.O. 2001. Using HACCP Principles and Physiological Studies to Improve Marketing Practices for Live Crustaceans. In: *Marketing and Shipping Live Aquatic Products*. (Eds. B.C Paust and A.A. Rice) Pp. 271-282. University of Alaska Sea Grant, Ak-sg-01-03/Facrbanks.

- Lucu, C. 1993. Ion transport in the gill epithelium of aquatic crustacea. *J. Exp. Zool.* **265**, 378-386.
- Magnum, C., McMahon, P., deFur, P. y Wheatly, M. 1985. Gas exchange, acid-base, and the oxygen supply to the tissues during a molt of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Crust. Biol.* **5-2**, 118-206.
- Morris, S. y Callaghan, J. 1998. The emersion response of the Australian Yabby *Cherax destructor* to environmental hypoxia and the respiratory and metabolic responses to consequent air-breathing. *J. Comp. Physiol.* **168**, 389-398.
- Morris, S., Greenaway, P. y MacMahon, B. R. 1995. Air breathing by the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). II Respiratory gas and acid-base status in response to emersion. *Physiol. Zool.* **69**, 806-838.
- Morris S. y Olier S. 1999. Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*: simulation studies of commercial shipping methods. *Comp. Bioch. Physiol.* **122**, 299-308.
- Pequeux 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* **15**, 1-60.
- Randall, D., Burggren W. y French, K. 1997. Animal Physiology. Mechanisms and adaptation. Ed. W. H. Freeman and Company, USA.
- Spicer, J. I., Hill, A. D., Taylor, A. C. y Strang, R.H.C. 1990. Effect of aerial exposure on concentrations of selected metabolites in blood of the Norwegian lobster *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Nephropidae). *Mar. Biol.* **105**, 129-135.
- Taylor E.W. y Bulter P.J. 1978. Aquatic and aerial respiration in the shore crab *Carcinus maenas* (L). Acclimated to 15 °C. *J. Comp. Physiol.* **127**, 315-323.
- Towle, D. y Magnum C. 1985. Ionic regulation and transport ATPase activities during the molt cycle in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Crust. Biol.* **5-2**, 216-222.
- Towle, D. W. 1993. Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. *J. Exp. Zool.* **265**. 387-396.

- Wheatly M. G, Souza C.R. y Hart M.K. 1996. Related changes in haemolymph acid-base status, electrolytes, and ecdysone in intermolt crayfish (*Procambarus clarkii*) at 23 °C during extracellular acid induced by exposure to air, hyperoxia or acid. *J. Crust. Biol.* **16(2)**, 267-277.
- Wheatly M.G., y Henry R. 1992. Extracellular and intracellular Acid-base regulation in crustaceans. *J. Exp. Zool.* **263**, 127-142
- Whiteley J. L. y Taylor. 1992. Oxygen and acid-base disturbances in the hemolymph the lobster *Homarus gammarus* during commercial transport and storage. *J. Crust. Biol.* **12(1)**, 19-30.
- Whiteley J.L., Breeze S.J. y McCann L. 2001. Effects of water salinity on acid-base balance in decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* **204**, 1003-1011.
- Wood C., Boutilier F. G. y Randall D.J. 1986. The physiology of dehydration stress in the land crab *Cardisoma carnifex*: Respiration, ionoregulation, acid-base and nitrogenous waste excretion. *J. Exp. Zool.* **126**, 271-296.
- Wood, C. y Cameron, J. 1984. Temperature and the physiology of intracellular and extracellular acid-base regulation in the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Biol.* **114**, 151-179.
- Whithers, C. P. 1992. Comparative Animal Physiology. Ed. Saunders. U.S.A.
- Young, M. 1978. Osmoregulation in three hermit crab species, *Clibanarius vittatus* (Bosc), *Pagurus longicarpus* say and *P. Pollicarus* say (Crustacea: Decapoda; anomura). *Comp. Biochem. Physiol.* **63A**, 377-382
- Zander P.I., 1977. Ionic regulation in the mangrove crab *Goniopsis cruetata*. *Comp. Biochem. Physiol.* **60**. 293-302.

**CAPÍTULO 3. EFECTO DE EMERSIÓN SOBRE COMPUESTOS
NITROGENADOS EN LA LANGOSTA *Panulirus interruptus***

3.1. INTRODUCCIÓN

Los animales excretan los productos excedentes en el metabolismo del nitrógeno como amoniaco, urea o ácido úrico (Wright, 1995). La forma y proporción de dichos productos son consecuencia de la nutrición, crecimiento, desarrollo, energía y ajustes fisiológicos al medio ambiente del animal (Claybrook, 1983).

La excreción de los compuestos nitrogenados, se hace necesaria debido a que el amoniaco, principal producto del catabolismo de aminoácidos, es tóxico. Su acumulación en tejidos corporales en concentración de 1 mmol.L^{-1} , implica toxicidad (Wright, 1995; Wright y col., 1996). Algunos autores mencionan que la toxicidad del amoniaco radica en el cambio de pH que provoca su aumento en fluidos corporales, afectando directamente las actividades enzimáticas (Schmitt y Uglow, 1996). Por otra parte describe alteración de las funciones cerebrales relacionadas con alta concentración de amoniaco (Wright, 1995).

En general los animales acuáticos son mas tolerantes a concentraciones altas de amoniaco en comparación de los terrestres (Wright, 1995). Debido a su bajo peso molecular y alta solubilidad en agua, el amoniaco puede atravesar fácilmente las diferentes membranas fisiológicas, sin que esto represente un

gasto energético elevado en especies acuáticas (Kormanik y Cameron, 1981; Claybrook, 1983; Schmitt, 1995).

El amoníaco es producto de reacciones del catabolismo de proteínas y aminoácidos por medio de la acción enzimática de aminoácido oxidasa, trans y deaminasas (Kormanik y Cameron, 1981; Regnault, 1987; Mathews, 1995). El término amoníaco total se utiliza para describir la mezcla del amoníaco (NH_3) y el ión amonio (NH_4^+). En medio acuoso ambas formas se encuentran en un equilibrio dependiente de pH (Mathews, 1995; Weihrauch y col., 1998).

En crustáceos el exceso de amoníaco se excreta a través de las branquias (70-95%) por medio de difusión y/o mecanismos de intercambio iónico (Kormanik y Cameron, 1981; Claybrook, 1983), o a través de bajas concentraciones en la orina (Hosie y col., 1991; Wright y col., 1996). Al igual que la respiración, la excreción de amoníaco a través de las branquias son procesos continuos mientras el animal está inmerso en agua. Cuando el animal se expone al aire, las branquias se colapsan y sus funciones se detienen (Regnault, 1987; De Fur y col., 1988).

En la mayoría de los crustáceos, los mecanismos de regulación ante esta acumulación de amoníaco dependen de las características de cada especie. Las especies intermareales y semiterrestres tienen un mayor grado de adaptación a la exposición aérea en comparación con las especies acuáticas (Schmitt y Uglow, 1996).

Durand y Regnault, (1998) y Durand y col., (1999), realizaron estudios en las especies *Carcinus maenas* (intermareal) y *Necora puber* (acuática), con respecto al metabolismo del nitrógeno durante la exposición aérea. La especie *Carcinus maenas* tiene una mayor habilidad para regular la acumulación de amoníaco en los tejidos, utilizando la síntesis de aminoácidos como proceso detoxificante. Por el contrario, la especie *Necora puber*, no presenta este mecanismo de regulación, observándose una acumulación de amoníaco en los diferentes tejidos.

Regnault, (1994), propuso una participación activa de glicosaminoglicanos en la acumulación de amoníaco en compartimentos intracelulares, en la especie *Carcinus maenas*. Posteriormente Durand y Regnault, (1998) comprobaron un aumento en la concentración de glicosaminoglicanos en las branquias de la misma especie de cangrejo. Esta síntesis se asoció a la deshidratación del tejido, lo cual a su vez favoreció la acumulación de NH_4^+ en la matriz extracelular. Al reincorporar al medio acuático a los cangrejos expuestos al aire, la naturaleza catiónica de los glicosaminoglicanos combinado a un pH adecuado, facilitaron la eliminación del NH_4^+ .

Por otra parte, en las especies *Hemigrapsus nudus* (Morris y col., 1995), *Jasus edwardsii* (Morris y Oliver, 1998), se ha encontrado un aumento en la

concentración de ácido úrico circulante en la hemolinfa. Los autores sugieren, que este aumento en ácido úrico puede ser una reserva temporal de amoníaco.

De los estudios descritos previamente, se deduce un mecanismo probable por medio del cual los crustáceos pueden disminuir la acumulación de amoníaco en la hemolinfa durante periodos de emersión. Dicho mecanismo es la formación de otros compuestos nitrogenados, diferentes a amoníaco ante el impedimento de excretarlo a su medio ambiente en forma normal. Estos productos pueden ser urea, aminoácidos o uratos.

Gomez-Jimenez, (1998), encontró un aumento en la concentración de amoníaco en la hemolinfa de *Panullirus interruptus* a partir de 12 h de exposición aérea a 7 °C, incrementando progresivamente hasta las 49 h (de 400 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a 5066 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Se desconoce si esta especie utiliza la síntesis de aminoácidos nitrogenados durante la exposición aérea como proceso de almacenamiento de amoníaco. Tampoco se sabe si el amoníaco y otros productos del metabolismo de nitrógeno varían en los diversos tejidos del animal, durante la exposición aérea. Por lo tanto, el presente trabajo se enfoca a generar mayor información sobre la concentración de diversos metabolitos asociados con nitrógeno tanto en hemolinfa como en músculo y hepatopáncreas.

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Captura y Mantenimiento de los Animales

Se seleccionaron 90 langostas de la especie *Panulirus interruptus* provenientes de Punta Abreojos, cooperativa ubicada en la zona central de la Península de Baja California. Los animales se trasladaron a la ciudad de La Paz B. C. S, a las instalaciones del CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste). En el traslado se siguieron los procedimientos que utilizan normalmente las cooperativas. Este consistió en colocar a las langostas en cajas de madera cubiertas con sacos de ixtle humedecidos con agua de mar y adicionalmente se colocaron sobre los sacos geles de congelación.

En laboratorio, los animales se colocaron en recipientes de fibra de vidrio de 800 L (35 animales por recipiente) o en contenedores plásticos individuales de 40 L. Se realizaron recambios diarios del 100 % del volumen, utilizando agua de mar filtrada (36 ppm y 20°C). Las langostas se mantuvieron en estas condiciones por un período de una semana. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con calamar, dejando de suministrarles comida 48 h previas a cada uno de los experimentos.

3.2.2. Experimento de exposición aérea a 7 °C y 20 °C.

En los dos experimentos de emersión, 35 animales se subdividieron en 5 grupos de 7 individuos cada uno. El primer grupo se utilizó como control, este se mantuvo inmerso en agua de mar y se utilizó para determinar la tasa de excreción de amoniaco de la especie, procedimiento que se describe en lo posterior. Los restantes 4 grupos se expusieron al aire, en recipientes plásticos de 40 L previamente cubiertos con sacos de ixtle humedecidos en agua de mar. Sobre ellos se acomodaron los animales y posteriormente se cubrieron con otro saco humedecido. Los recipientes fueron colocados dentro de una cámara donde se controló la temperatura ambiente (± 0.1 °C), con humedad relativa de 96 ± 0.4 %. Después de transcurrir 1, 4, 7 y 10 h se extrajo la muestra de hemolinfa a los animales de cada grupo y se realizó la disección para la recolección de las muestras de músculo y hepatopáncreas. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiental de 7 °C y 20 °C.

3.2.3. Determinación de la tasa de excreción de amoniaco.

En la realización de la tasa de excreción de amoniaco, se colocaron 7 langostas en acuarios individuales con un volumen medido de agua de mar filtrada (16 L), dentro de una cámara en condiciones similares a los

experimentos de emersión. Estos animales se mantuvieron en condiciones estables, sin ningún estímulo externo. Se tomaron muestras de agua de mar (1 mL) en tubos eppendorf cada hora, durante un promedio de 8 h posteriores a la colocación de los animales en los acuarios. Después de la última toma de muestra de agua, los animales se pesaron. Se procedió a la disección y toma de muestras, realizándolo como se describe en lo posterior. Los datos de este grupo se toman como grupo control.

En el laboratorio se determinó la concentración de amoníaco en las muestras de agua por medio de la técnica de inyección de flujo (FIA), descrita mas adelante. En base a la concentración de amoníaco determinada de cada muestra, se calculó la tasa de excreción de amoníaco registrando los datos en unidades de $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

3.2.4. Tasa de excreción de amoníaco después de 10 h de emersión.

En la determinación de la tasa de excreción de amoníaco, 7 animales en cada una de las temperaturas (7 °C y 20 °C) se expusieron al aire por 10 h bajo las mismas condiciones de los experimentos de emersión descritos anteriormente. Posteriormente los animales se colocaron en acuarios individuales, con un volumen medido de agua de mar filtrada (16 L). Se tomó 1 mL de agua de mar como muestra después de 1, 3, 30, 60, 120 y 180 minutos.

Después de la última colección de muestras, los animales se pesaron, se extrajo hemolinfa y se sacrificaron para la extracción de las muestras de músculo y hepatopáncreas, como se describe posteriormente.

Las muestras se congelaron y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En laboratorio, se determinó la concentración de amoníaco por medio de la técnica de inyección de flujo (FIA) en unidades de $\mu\text{ moles.mL}^{-1}$. Finalmente se calculó la tasa de excreción de amoníaco, registrándose en unidades de $\mu\text{ mol g}^{-1}\text{ h}^{-1}$.

3.2.5. Obtención y manejo de muestras.

Para la extracción de hemolinfa se utilizaron jeringas plásticas de 5 mL por medio de punción directa en el espacio entre el 4° ó 5° pleópodo del animal. En dos extracciones entre 8 y 10 mL de hemolinfa, la cual se colocó en tubos de polietileno de 10 mL.

Para la obtención de las muestras de músculo (5 g) y hepatopáncreas (3 g) se requirió de la disección de los animales (Fig 13). El primer paso de la disección consistió en la separación manual del abdomen – cefalotórax (Fig. 13a). Debido a esta separación, en la porción del abdomen quedó expuesto el músculo, de donde se tomó la muestra por corte directo con tijeras de disección (Fig 13b). Para extraer la muestra de hepatopáncreas se requirió de un

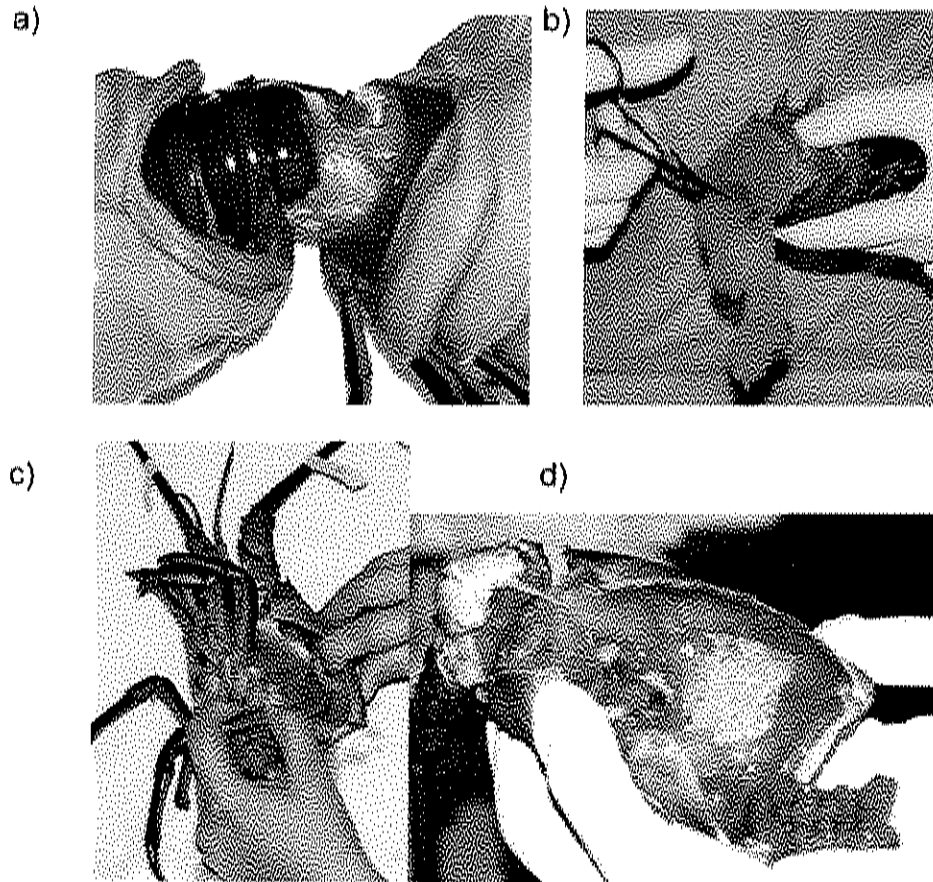


Figura. 13. Toma de muestras de la langosta *Panulirus interruptus*, durante el experimento de emersión. a) separación abdomen-cefalotórax, b) corte muestra músculo, c) separación cefalotórax, d) obtención muestra hepatopáncreas

segundo paso en la disección: la separación completa del cefalotórax (Fig 13c), teniendo con ello acceso a los órganos internos del animal, extrayendo fácilmente el hepatopáncreas (Fig. 13d). Ambos tejidos se etiquetaron y colocaron en bolsas de polietileno.

Todas las muestras (hemolinfa, músculo, hepatopáncreas y agua de mar), se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después se trasladaron a las instalaciones de CIAD, A. C., en Hermosillo, donde finalmente se congelaron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniéndose así hasta su posterior análisis en el laboratorio de fisiología de invertebrados.

3.2.6. Determinación de amoníaco

La determinación de amoníaco tanto en las muestras de hemolinfa y agua de mar se realizó por medio de la técnica de inyección de flujo (Flow Injection Analysis, FIA), adaptada para volúmenes pequeños por Hunter y Uglow, (1993).

La técnica consistió en flujos continuos de los reactivos NaOH 0.1 M y azul de bromolímol, por medio de un sistema que se acopló a una bomba peristáltica y proporcionó una velocidad de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a las fases móviles. Se inyectaron $100\text{ }\mu\text{L}$ de muestra por medio de una válvula Rheodyne 5020 al flujo de NaOH, con ello los iones amonio (NH_4^+) pasan a amoníaco (NH_3). Este

cambio se realizó dentro de uno de los conductos de una celda que tenía implementada una membrana permeable a gases, dicha membrana permitió que el amoniaco se difundiera hacia el flujo adyacente que transportó al indicador azul de bromotimol. El amoniaco provocó cambios en el pH y por tanto en el color del indicador (a pH de 6.5 es de color verde a pH de 8 de color azul). Este cambio se midió por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 635 nm. La variación en el cambio del indicador se registró en un programa de computadora (PICOLOG), el cual reportó gráfico los resultados. La cuantificación se realizó por la elaboración de una curva de calibración estándar de sulfato de amonio y se registró como $\mu\text{mol. L}^{-1}$ o bien como $\mu\text{mol. g}^{-1}$.

En la preparación de las muestras de hemolinfa únicamente se descongelaron las muestras y se realizaron las diluciones convenientes según la concentración de amoniaco (1:10, 1:100 y 1:1000). En la preparación de las muestras de músculo, se pesó 1 g de muestra y se homogenizó con 1.0 mL de ácido perclórico al 6%, durante un minuto, a una velocidad de 500 g. Para eliminar las partículas de tejido, la muestra se centrifugó 10 000 g por 30 min a 4°C en una centrifuga Beckman G5-15 a. El sobrenadante se guardó en tubos eppendorf y se congeló a - 30 °C. Finalmente las muestras se descongelaron y se realizó la dilución al igual que en las muestras de hemolinfa, para su inyección en el sistema FIA.

3.2.7. Determinación de proteína en hemolinfa.

La concentración de proteína total se cuantificó por el método de Bradford (1976), con adaptación a microplacas. Se utilizó albúmina de suero de bovino como estándar. El método consistió en adicionar 200 μ L de solución de Bradford a 10 μ L de muestra, mezclando e incubando la microplaca de 96 pozos por 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó la lectura a 560 nm en lector ELISA.

3.2.8 Determinación de aminoácidos libres.

La determinación de aminoácidos en hemolinfa, músculo y hepatopáncreas se realizó por HPLC con base a lo reportado por Vázquez-Ortiz y col. (1995), con modificaciones.

La técnica se basa en la interacción entre 2-mercaptoetanol y o-ftaldehído (OPA), con las aminas primarias de los aminoácidos para producir un compuesto fluorescente. Las longitudes de onda de excitación y emisión del complejo formado son a 360 y 455 nm respectivamente. Al medir con un detector fluorescente a dichas longitudes de onda y adicionando un estándar interno (ácido alfa-aminobutírico), se puede cuantificar la concentración de aminoácidos en la muestra.

La técnica se montó con el siguiente equipo: bomba Varian 9010, acoplada a un detector fluorescente Varian Fluorichrom II, conectado a un software Varian versión 4.0 (Varian Assoc. Inc Walnut Creel, USA). Las muestras se inyectaron por medio de una válvula Rheodyne Modelo 7120 (Berkeley, CA, USA). La separación de los aminoácidos se llevó a cabo en una columna comercial Varian de 10 cm X 4.6 I.D. Microsorb Short-one RPC₁₀ 3 μ m utilizada en fase reversa.

Las condiciones de la cromatografía fueron: 1.5 mL.min⁻¹ de solvente A: metanol, sol. B: buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 7.2, metanol puro y 1% de tetrahidrofurano (900:95:10 v/v/v). En la tabla 2 se encuentran los gradientes utilizados en la corrida. Después de los 25 min. de corrida se dejaron pasar 10 min mas para equilibrar la columna y posteriormente se realizó la siguiente inyección. Todos los reactivos y solventes utilizados fueron grado HPLC. Finalmente se calcularon por medio de los cromatogramas, las áreas de cada aminoácido en las muestras y los estándares utilizados, para la obtención de la concentración de cada uno. Las concentraciones se registran como μ mol.L⁻¹ en hemolinfa y μ mol.g⁻¹ en los tejidos.

La preparación de la muestra de hemolinfa fue la siguiente: primero se realizó una precipitación de proteínas con ácido perclórico al 6% en relación 1:1, se centrifugó a 2000 g por 5 min en una centrifuga Beckman G5-15, para la

Tabla 2. Gradiente utilizado para la determinación de aminoácidos por HPLC.

| Tiempo | % A | % B |
|--------|-----|-----|
| 0.0 | 80 | 20 |
| 5.0 | 70 | 30 |
| 8.0 | 70 | 30 |
| 10.0 | 50 | 50 |
| 15.0 | 50 | 50 |
| 18.0 | 20 | 80 |
| 22.0 | 20 | 80 |
| 25.0 | 80 | 20 |

eliminación del precipitado. Posteriormente se tomaron 100 μL del sobrenadante y se diluyeron a 1 mL adicionando 40 μL de estándar interno, para su inyección en el cromatógrafo. De esta última solución se tomaron 250 μL y se mezclaron con 250 μL de OPA llevando a cabo una filtración (0.22 μm) de la muestra antes de inyectarla en el cromatógrafo. Estos dos pasos (mezcla con OPA y filtración) deben realizarse en un tiempo de dos min. para favorecer la reacción entre aminoácidos y reactivos. Finalmente, la muestra derivatizada se inyectó en el cromatógrafo. La concentración de aminoácidos en hemolinfa se registra como $\mu\text{ moles.L}^{-1}$.

Un gramo de cada muestra de músculo y hepatopancreas se homogenizó con 1 mL de ácido perclórico al 6% para la eliminación de proteínas. El homogenizado fue centrifugado a 2000 g por 5 min. en una centrifuga Beckman G5-15. Debido al alto contenido de aminoácidos en las muestras, se realizó una primer dilución. Se tomaron 300 μL del sobrenadante y se aforaron a 5 mL con agua grado HPLC. Se tomaron 100 μL de la solución anterior para realizar la derivación con el reactivo OPA (adicionando 40 μL de estándar interno) y la posterior inyección de la muestra en el cromatógrafo. Las condiciones de la cromatografía fueron iguales a las que se utilizaron para cuantificar los aminoácidos en hemolinfa. En el caso de músculo y hepatopancreas las concentraciones se registran en $\mu\text{ mol.g}^{-1}$.

3.2.9. Análisis Estadísticos.

Se realizó un análisis de varianza de efectos fijos para un diseño factorial 2 X 6. El efecto principal A, temperatura con dos niveles y el efecto principal B, el tiempo de exposición aérea con 6 niveles. La diferencia significativa entre los factores y los niveles, se determinó por medio de la prueba de intervalos de Tukey (0.05).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Traslado y mantenimiento de los animales

Durante el traslado de los animales vivos en el trayecto, Punta Abreojos - La Paz se tuvo una sobrevivencia del 100 %. En el viaje de la cooperativa al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (11 h aprox.), la temperatura ambiente promedio fue de 19.1 °C y en los contenedores de 14.2 °C (registros de termógrafos).

3.3.2. Compuestos nitrogenados.

La tasa de excreción de amoníaco de la langosta (Fig. 14) *Panulirus interruptus*, aumentó debido al efecto de temperatura, siendo menores los valores de eliminación de amoníaco a 7 °C, que 20 °C ($p < 0.05$). Lo anterior puede visualizarse fácilmente en la gráfica, donde el valor del grupo control a 7°C ($0.3 \mu \text{ mol. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) representa el 50 % del determinado a 20°C ($0.6 \mu \text{ mol. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Asimismo, los valores registrados a 7 °C después de 1, 3, 30, 60 y 120 min. de reinmersión fueron menores en relación de 72.1%, 77.6%, 35.8%, 47% y 54.5%, respectivamente; en comparación a las velocidades de excreción de amoníaco a 20 °C.

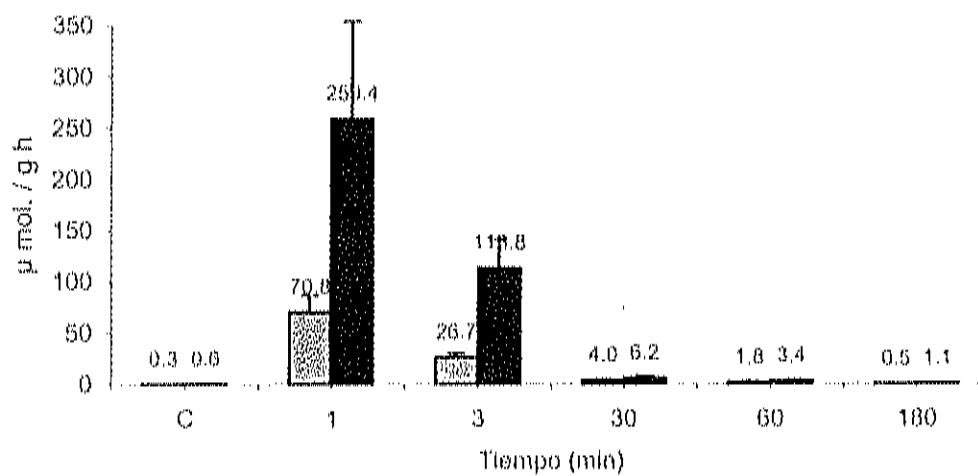


Figura 14. Tasa de excreción de amoniaco de la especie *Panullirus interruptus*, después de una emersión de 10 horas bajo dos temperaturas: 7 °C (▨) y 20°C (■) (C) Tasa de excreción de la langosta bajo condiciones control.

La mayor proporción del amoníaco acumulado durante el período de emersión en ambas temperaturas fue eliminado en aproximadamente 30 min. La eliminación fue de 705.7 μ mol de amoníaco / 100 g de peso corporal en los animales expuestos a 7 °C y de 2045 μ mol / 100 g, en las langostas expuestas a 20 °C. Conforme transcurrió el tiempo de reinmersión, las tasas fueron disminuyendo progresivamente ($p < 0.05$). A pesar de la disminución, después de 180 min. los animales mantenían velocidades de eliminación mayores a los valores determinados en los respectivos grupos control. A 7 °C el valor en la excreción de amoníaco es un 64 % mayor y a 20 °C un 91 % que sus controles.

La concentración de amoníaco extracelular (hemolinfa) en emersión fue variable (Fig. 15) con una concentración menor a 7 °C en comparación con 20°C ($p < 0.05$). En el experimento a 7 °C no se registró diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en la concentración de amoníaco en hemolinfa durante los tiempos de emersión (1 - 10 h). De la misma forma, tampoco se determinaron diferencias con respecto a el grupo control (C) ni con el grupo de reinmersión (Re). El rango de variación de amoníaco fue de $353.6 \pm 79.1 \mu \text{ mol.L}^{-1}$ a $646.4 \pm 177.7 \mu \text{ mol.L}^{-1}$. En la Tabla 3 se observa el porcentaje de acumulación de amoníaco en hemolinfa y músculo a 7 °C y 20 °C. En dicha tabla se consideró solo la concentración promedio en cada tiempo de emersión, sin analizar por tanto la variación dentro de cada grupo. Los resultados de la acumulación aparente de

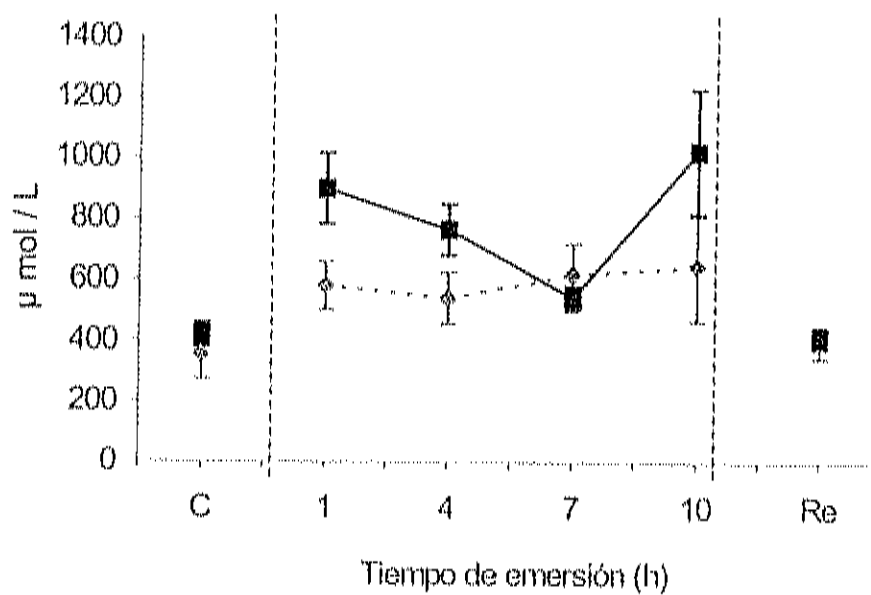


Figura 15. Concentración de amoníaco en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (\diamond —) y 20°C (\blacksquare —). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (\diamond) y 20°C. (\blacksquare).

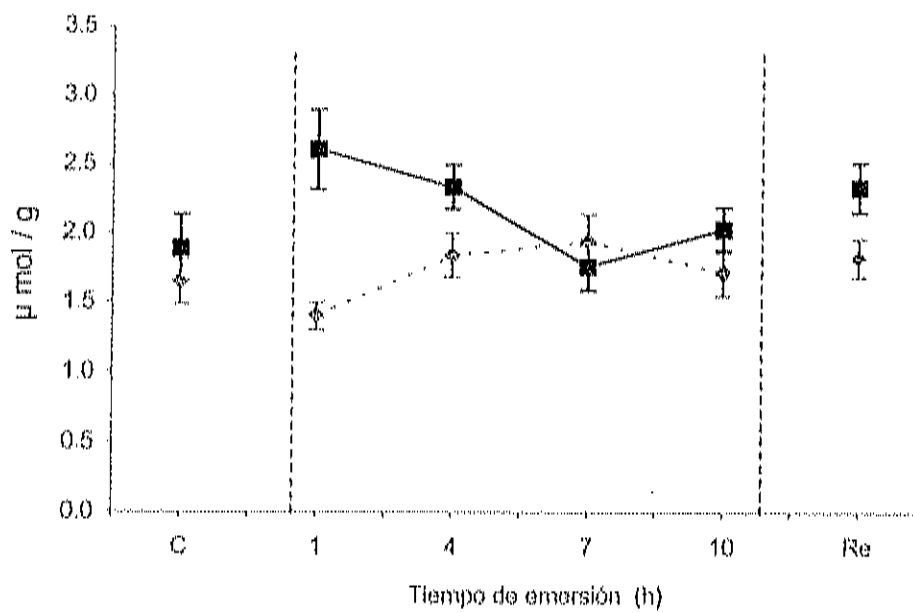
amoníaco en la hemolinfa a 7 °C muestran un porcentaje alrededor de 70 % (Tabla 3).

En contraste, la concentración de amoníaco en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* a 20 °C, aumentó durante el tiempo de emersión, siendo significativa la diferencia con respecto al grupo control (C) y Re ($p < 0.05$). Durante la primera hora de emersión hay un aumento de $420.5 \pm 38.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $899.6 \pm 115.8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ con respecto al grupo control. Posteriormente, la concentración disminuyó hasta $541.6 \pm 38.19 \mu\text{mol.L}^{-1}$ después de 7 h de emersión. En el período entre 7 y 10 h hay nuevamente un aumento llegando hasta $1022.8 \pm 207.9 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Esto se observa mas fácilmente en el % de acumulación de amoníaco en hemolinfa (Tabla 3) con valores de 114, 82, 28, y 143 % para 1, 4, 7, y 10 h, respectivamente, en comparación a la concentración del grupo control. Por otra parte, después de 2 h de reinmersión la concentración de amoníaco disminuyó a $415.4 \pm 34.3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ valores similares a los del grupo control.

La concentración de amoníaco intracelular, músculo (Fig. 16), no se observó variación significativa ($p \geq 0.05$) por efecto de temperatura o tiempo de exposición aérea. Tampoco hubo diferencias en los valores con respecto a los grupo (C) y (Re). El rango de fluctuación en la temperatura de 7 °C para amoníaco en músculo fue de $1.4 \pm 0.1 \text{mmol.L}^{-1}$ a $1.9 \pm 0.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ y a 20 °C

Tabla 3. Porcentaje de acumulación de amoníaco en hemolinfa y músculo de la langosta *Panillurs interruptus* durante emersión en ambas temperaturas 7° y 20 °C.

| Tiempo emersión (h) | Hemolinfa | | Músculo | |
|---------------------|-----------|------|---------|-------|
| | 7°C | 20°C | 7°C | 20°C |
| 1 | 64 | 114 | 13.2 | 38.1 |
| 4 | 52 | 82 | 11.5 | 23.81 |
| 7 | 75 | 28 | 17.5 | -6.88 |
| 10 | 83 | 143 | 4.2 | 7.41 |



7

Figura 16. Concentración de amoniaco en el músculo de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (\diamond) y 20°C (\blacksquare). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (\diamond) y 20°C (\blacksquare).

fue $1.7 \pm 0.17 \mu \text{ mol.L}^{-1}$ a $2.6 \pm 0.2 \mu \text{ mol.L}^{-1}$. La acumulación aparente de amoniaco en este compartimento fue menor a 7°C (Tabla 3) que a 20°C . El porcentaje de acumulación al final de las 10 h de emersión fue de 4.2 y 7.4 % a 7 y 20°C respectivamente.

La concentración de proteínas en hemolinfa (Fig. 17) no varió significativamente ($p \leq 0.05$) por efecto de temperatura o tiempo de exposición aérea. Tampoco hubo diferencias en los valores con respecto a los grupo (C) y (Re). El rango de fluctuación de proteína en la temperatura de 7°C fluctuó entre 115.1 ± 11.6 y $129.4 \pm 26.0 \text{ mg.mL}^{-1}$ a 7°C y desde 102.7 ± 15.8 a $130.0 \pm 6.7 \text{ mg.mL}^{-1}$, a 20°C .

En cuanto a las variaciones de los aminoácidos(AA), en primer lugar se presenta la concentración de aminoácidos totales (AAT) en hemolinfa (Fig. 18). En las Figuras 19 y 20 se muestra la variación en la concentración de AA individuales a las 10 h de emersión, con respecto al control y a la reinmersión (después de 2 h) en los tres compartimentos analizados en la langosta *Panulirus interruptus*. Posteriormente se presenta la concentración de los AAT en músculo (Fig. 21) y hepatopáncreas (Fig. 22).

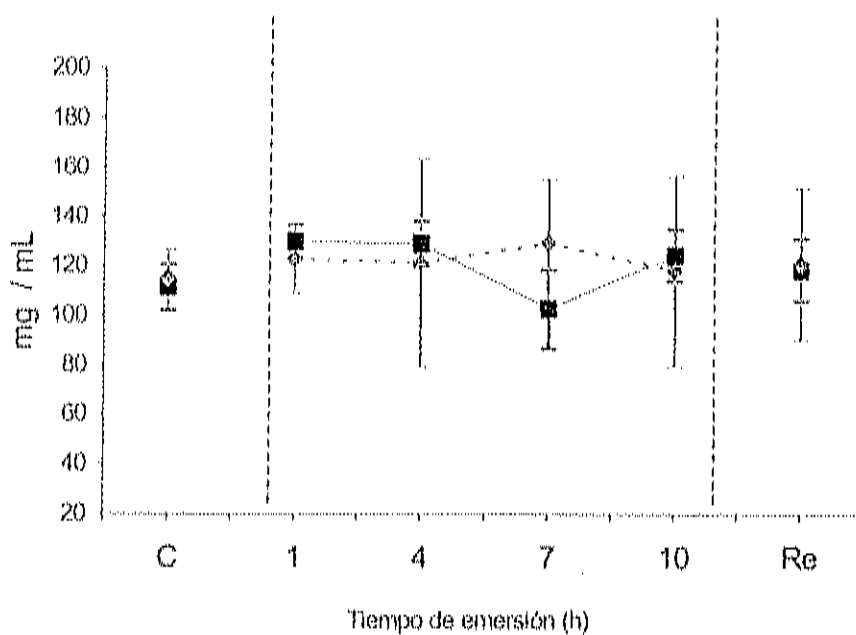


Figura 17. Concentración de proteína en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◆) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reímersión por 2 h a 7°C (◆) y 20°C (■).

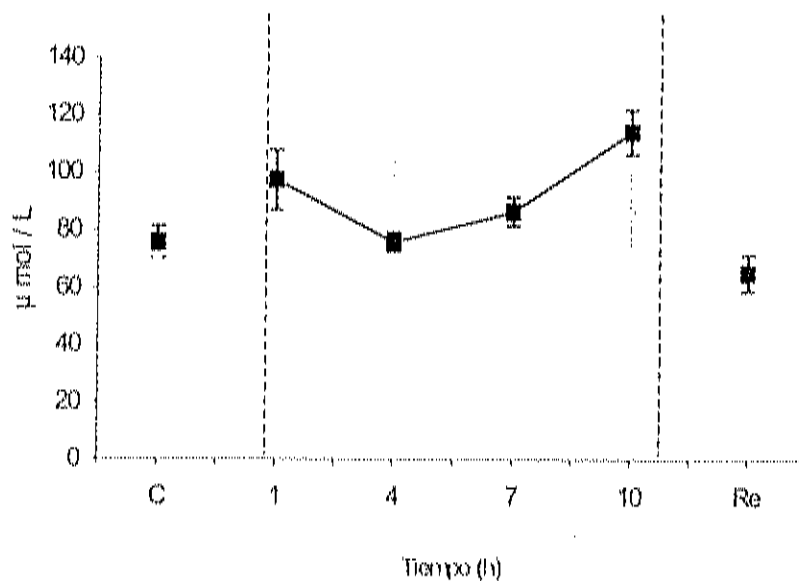


Figura 18. Concentración de aminoácidos totales (AAT) en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◇) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (◇) y 20°C (■).

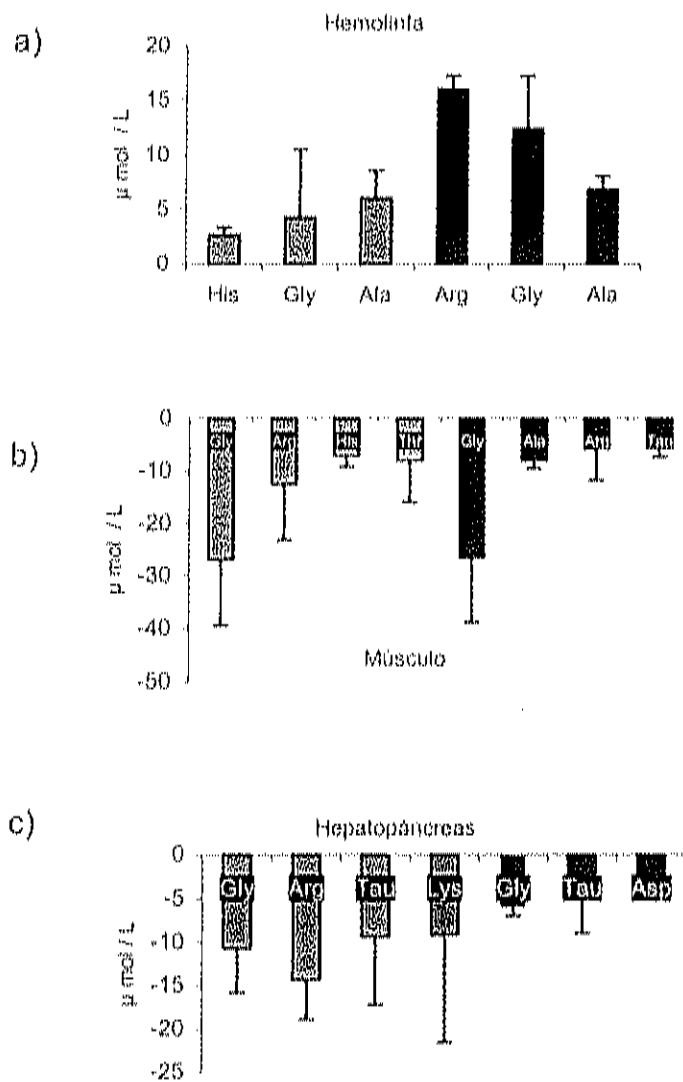


Figura 19. Variación determinada en algunos AA individuales de la langosta *Panulirus interruptus*. (a) hemolinfa, (b) músculo y (c) hepatopáncreas a 7 °C (◆) y 20 °C (■), Comparando las concentraciones los AA del grupo control (C) y 10 h de emersión.

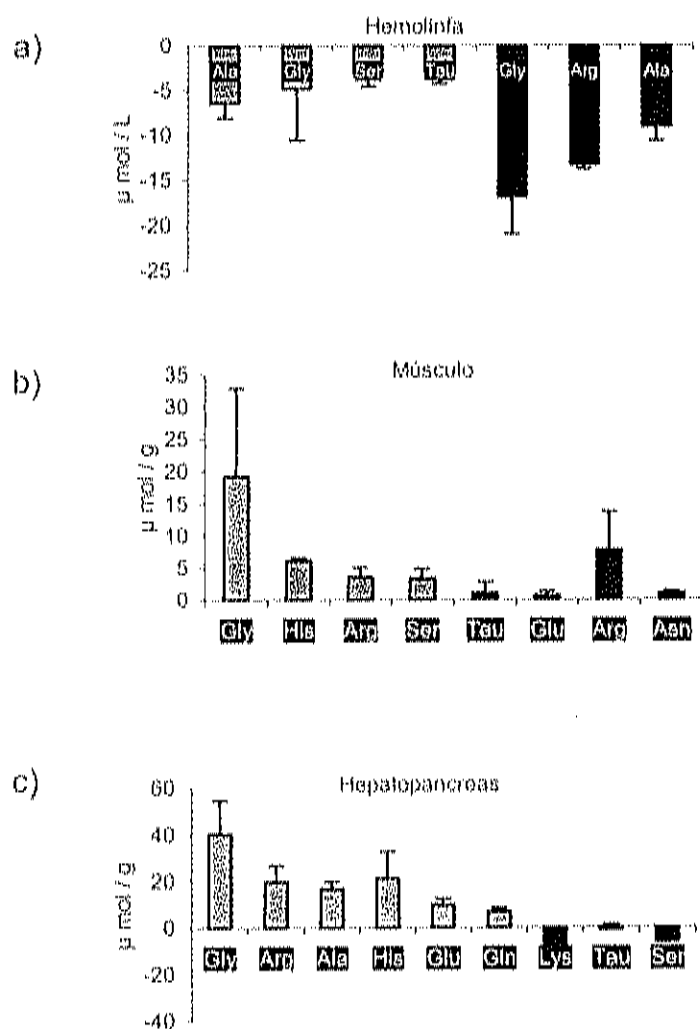


Figura 20. Variación de la concentración de AA individuales en la langosta *Panulirus interruptus*. (a)hemolinfia, (b)músculo y (c)hepatopáncreas a 7 °C (◆) y 20 °C (■) Los resultados se obtuvieron al comparar las concentraciones de los AA a las 10 h de emersión y del grupo de reinmersión (Re).

La concentración de AAT en la hemolinfa de la langosta *Panulirus interruptus* (Fig. 18), no registró diferencia por efecto de temperatura de exposición ($p \geq 0.05$). Sin embargo por el tiempo de emersión y reinmersión (Re) sí registró variación ($p < 0.05$). A 7 °C la concentración de AAT en el grupo control fue de $72 \pm 7.5 \mu \text{ mol.L}^{-1}$, la cual al final de las 10 h de emersión aumentó hasta $86.11 \pm 14 \mu \text{ mol.L}^{-1}$, este ligero aumento se debe principalmente a los aminoácidos histidina, glicina y alanina (Fig. 19 a). Posterior a un periodo de reinmersión de 2 h, la concentración de AAT disminuyó a $56.37 \pm 5.8 \mu \text{ mol.L}^{-1}$, valor es menor a el registrado para el grupo control. Los aminoácidos asociados a esta disminución (Fig. 10 a) son alanina, glicina, serina y laurina, en mayor proporción.

A 20 °C, la concentración de AAT en condiciones control fue de $76 \pm 5.5 \mu \text{ mol.L}^{-1}$. Después de 10 h de emersión, la concentración de AAT aumentó hasta $114.3 \pm 7.8 \mu \text{ mol.L}^{-1}$, siendo los aminoácidos asociados a este aumento arginina, alanina y glicina (Fig. 18 a). Después de 2 h de reinmersión, la concentración disminuyó a $65.7 \pm 6.3 \mu \text{ mol.L}^{-1}$, valor menor al del grupo control. Los aminoácidos asociados a esta disminución a 20 °C fueron arginina, alanina y glicina (Fig. 20 a).

En el músculo de la langosta *Panulirus interruptus* la concentración de AAT (Fig. 20) no presentó diferencia por temperatura de exposición ($p \leq 0.05$)

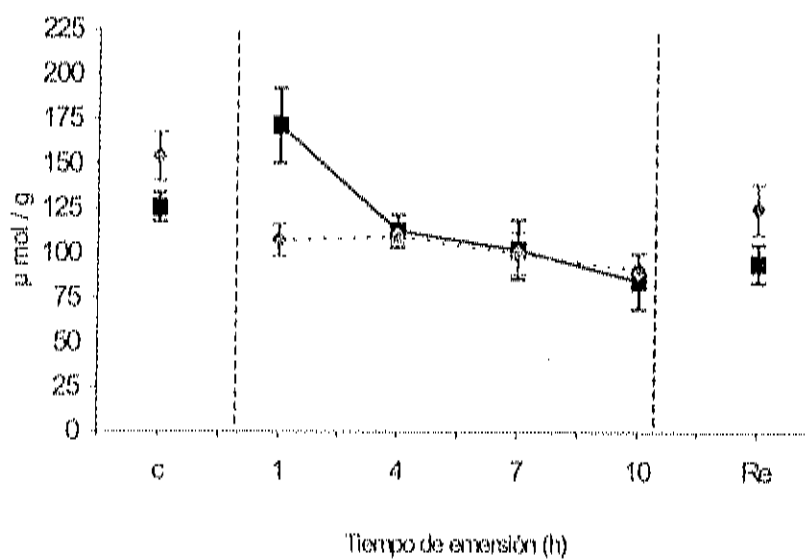


Figura 21. Concentración de aminoácidos totales (AAT) en el músculo de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (\diamond - - -) y 20°C (\blacksquare - - -). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (\diamond) y 20°C. (\blacksquare).

Durante el tiempo de emersión se observó en ambas temperaturas una disminución progresiva de los AAT ($p < 0.05$), la cual fue recuperada parcialmente después de 2 h de reinmersión.

A 7 °C la concentración de AAT en el músculo en el grupo control fue de $154.2 \pm 13.4 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Durante el tiempo de emersión se observó una disminución progresiva, llegando a $91.2 \pm 9.7 \mu\text{mol.g}^{-1}$ a las 10 h, debida a los aminoácidos glicina, arginina, histidina y treonina (Fig. 19 b). Después de 2 h de reinmersión, la concentración se equilibró parcialmente, aumentando a $125.9 \pm 14.1 \mu\text{mol.g}^{-1}$ lo cual puede asociarse a los aminoácidos (Fig. 20b) histidina, serina, glicina y arginina.

En la exposición a 20 °C, la concentración de AAT en el músculo fue de $125.8 \pm 8.1 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en el grupo control (C). Aunque hubo un aumento en la concentración de AAT a la hora de emersión, al final de las 10 h la concentración disminuyó hasta $85.1 \pm 15.5 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Los AA que más influyeron en esta caída fueron (Fig. 19b) glicina, alanina, arginina y taurina. Por otra parte, después de 2 h de reinmersión la concentración de AAT aumentó a $95.1 \pm 10.7 \mu\text{mol.g}^{-1}$, asociándose a este aumento los aminoácidos taurina, ácido glutámico, arginina y asparagina (Fig. 20b).

Finalmente, en el hepatopáncreas no hubo efecto en la concentración de AAT (Fig. 21) por temperatura de exposición. Durante el experimento a 7 °C, la

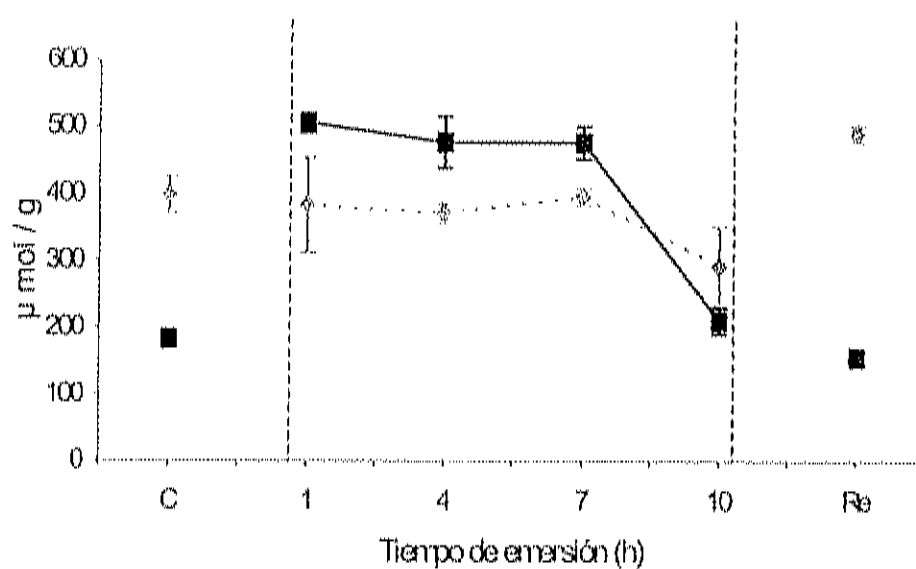


Figura 22. Concentración aminoácidos totales (AAT) en hepatopáncreas de la langosta *Panulirus interruptus* durante el experimento de emersión a 7°C (◇) y 20°C (■). (C) Grupo control; (Re) grupo en reinmersión por 2 h a 7°C (◇) y 20°C (■).

concentración del grupo control fue de $398.2 \pm 26.7 \mu\text{mol.g}^{-1}$, similar a la de las primeras horas de emersión. Sin embargo entre 7 y 10 h de emersión se registró una disminución en la concentración de AAT, asociada a los aminoácidos glicina, arginina taurina y licina (Fig. 19c). Después de 2 h de emersión, la concentración de AAT se equilibró, aumentando hasta $498.8 \pm 11.7 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Este aumento se debió principalmente a los aminoácidos glicina, arginina, alanina, histidina, ácido glutámico y glutamina (Fig. 20c).

En la temperatura de 20 °C, la concentración de AAT en el grupo control fue de $183.2 \pm 7.9 \mu\text{mol.g}^{-1}$ aumentando durante la primera hora de emersión. A pesar de este aumento inicial, la concentración después de las 10 h de emersión disminuyó hasta un valor cercano al del grupo control ($210.7 \pm 19.3 \mu\text{mol.g}^{-1}$) Esta disminución se debió a los aminoácidos (Fig. 19c) glicina, taurina, y ácido aspártico. Después de 2 h de reinmersión, la concentración de AAT disminuyó hasta $156.4 \pm 5.2 \mu\text{mol.g}^{-1}$, sin el predominio de alguno de los aminoácidos individuales.

3.4. DISCUSIÓN

El amoniaco producido durante el tiempo de emersión de la langosta *Panulirus interruptus*, se acumuló en la hemolinfa y probablemente en algún otro sitio de almacenamiento, ante el impedimento de excretarlo a su medio exterior. Lo anterior fue más evidente en la temperatura de 20 °C comparación que a 7 °C.

Al comparar la velocidad de eliminación de amoniaco en condiciones normales, a 20 °C esta fue 50 % mayor que a 7 °C. Durand y col., (2000), determinaron en el cangrejo *Mala squinado* un aumento en la tasa de excreción por efecto de temperatura de $0.14 \pm 0.03 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ a $0.45 \pm 0.05 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ a 10°C y 20 °C, respectivamente. Por otra parte, la velocidad de eliminación de amoniaco a 7 °C ($80.3 \pm 0.02 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$) se encuentra en un rango cercano a lo determinado por Gomez-Jimenez y col., (1998), con un valor de $0.27 \pm 0.03 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ obtenido en estudios con la misma especie, bajo las mismas condiciones experimentales. En cuanto a la velocidad de eliminación de amoniaco de *P. Interruptus* a 20 °C ($0.6 \pm 0.03 \mu \text{ mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$) está fue comparable a la especie *Necora puber* a 18 °C que mostró $0.55 \pm 0.04 \mu \text{ mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$. (Durand y Regnault, 1998). Se hace comparación con esta especie, ya que comparte con *P. interruptus* la característica en ser totalmente acuática por lo que normalmente no se expone al aire durante su ciclo de vida.

Por otra parte, la acumulación de amoníaco en la hemolinfa de la langosta *P. interruptus*, durante emersión fue mayor en la temperatura de 20 °C que a 7 °C. es un patrón registrado en varias especies de crustáceos. Ante el impedimento de excretar el amoníaco al medio ambiente durante emersión entre 8 y 12 h, también lo acumulan en la hemolinfa, *Cancer pagurus*, *Nephrops norvegicus*, *Necora púber* (Regnault, 1992; Schmitt y Uglow, 1996; Durand y Regnault, 1998). Está estudiado el efecto de la temperatura sobre la acumulación de amoníaco en la hemolinfa durante emersión. Chen y Chen, (1998) registraron una acumulación de amoníaco mayor en la hemolinfa después de 12 h de emersión conforme aumentó la temperatura de exposición en la especie *Penaeus japonicus* . Al igual que en el cangrejo *Maia squinado*, el contenido de amoníaco en la hemolinfa aumentó en las primeras 12 h de emersión en mayor proporción a 20 °C que a 10 °C (Durand y col., 2000).

Además de la acumulación de amoníaco en hemolinfa, el músculo es otro tejido en el cual se puede llevar a cabo el almacenamiento de amoníaco durante emersión. Durand y Regnault, (1998), determinaron que en la especie *Necora púber* se acumula amoníaco en este tejido en las primeras horas de emersión. Los mismos autores mostraron que en la especie *Carcinus maenas* además de almacenar temporalmente el amoníaco en el músculo, también puede sintetizar de otros compuesto nitrogenados como proceso de detoxificación. En comparación a los dos ejemplos mencionados, en la especie *P. interruptus*, el

músculo, simplemente no fue utilizado como reserva para este compuesto nitrogenado a ninguna de las dos temperaturas.

Panulirus interruptus presentó con una evidente acumulación de amoniaco en hemolinfa (compartimiento extracelular) durante emersión el cual eliminó en reinmersión rápidamente (30 min). En el cangrejo *C. maenas* Regnault y Durand, (1998), encontraron una explicación para una eliminación rápida de amoniaco. En las branquias de este cangrejo aumento la concentración de glicosaminoglicanos durante la emersión, con la finalidad de evitar la deshidratación . Además, este polímero aniónico, puede favorecer el almacenamiento de NH_4^+ , en el compartimiento extracelular. De la misma forma, cuando el medio es favorable nuevamente (inmersión en agua con un pH adecuado), estos compuestos también favorecen una eliminación rápida del amoniaco debida al intercambio iónico. Por tanto, queda como tarea para una investigación posterior el determinar la concentración de glicosaminoglicanos en la langosta *Panulirus interruptus* durante emersión.

Durand y Regnault, (1998), sugirieron que la especie *Carcinus maenas* puede regular el metabolismo nitrogenado durante emersión, sintetizando aminoácidos. En un estudio posterior, Durand y col., (1999) confirmaron que la especie utiliza la síntesis de AA como proceso de detoxificación durante exposición aérea prolongada .

La posibilidad de que *Panulirus interruptus*, utilice la síntesis de aminoácidos para la regulación de la acumulación de amoniaco en hemolinfa es prácticamente nula. En forma general, los aminoácidos asociados a la variación de la concentración tanto en hemolinfa como en músculo y hepatopáncreas están relacionados mas a funciones metabólicas de energía (alanina, arginina) y síntesis de otros componentes del metabolismo de purinas (glicina), que a la acumulación de nitrógeno (glutamina, glutámico). Por otra parte Jian-Chu Chen y col., (1994), mencionan que los aminoácidos taurina, glutamina, alanina, arginina y glicina en la hemolinfa, son moléculas que participan como osmolitos en la regulación de la osmolaridad de este fluido en crustáceos.

A 7 °C después de 10 h de emersión los AAT aumentan en hemolinfa y en hepatopáncreas, y disminuyen en músculo. Debido a la clase de AA involucrados, es evidente que el animal requiere energía para el mantenimiento de sus funciones bajo estas condiciones adversas. La disminución en la concentración de aminoácidos en músculo y su aumento en la hemolinfa, puede indicar una movillización de los mismos entre los compartimientos intra y extracelular. Además, la concentración de glutamina y glutámico, durante el tiempo de exposición registraron una disminución progresiva.

A 20 °C, el patrón fue muy similar al descrito a 7 °C, solo que la movillización de AA al final de las 10 h de emersión fue en mayor proporción. Esto se evidenció por un aumento AAT en hemolinfa, y una disminución de los

mismos en músculo y el hepatopáncreas. Asociada esta movilización de aminoácidos, en el mismo período se registró una disminución de la presión osmótica en la hemolinfa de la langosta (Capítulo 2). Por esto se considera que el aumento de AA en la hemolinfa fue un mecanismo para el mantenimiento de la osmolaridad.

Finalmente, al final de las 10 h de emersión la mayor acumulación de amoníaco fue en el espacio extracelular, es decir en hemolinfa, mientras que la fracción almacenada en músculo fue mínima. Sin embargo a las 7 h de emersión hubo una disminución de la acumulación de amoníaco especialmente en los animales más estresados (20 °C), tanto en hemolinfa como en músculo. Ante esto, se especula que puede haber otro órgano, o sub-compartimiento que en dicho período secuestra el amoníaco.

En una revisión de la regulación del balance ácido-base en crustáceos, Wheatly y Henry, (1992), mencionan el compartimiento del caparazón como una cámara con alto contenido de NH_4^+ y bajo en otros iones. Además de esto, la regulación iónica del balance ácido-base de esta cámara, es independiente a través de una capa celular no caracterizada (Wheatly y col., 1991; Sander y Childress, 1988).

Así, en la langosta *Panulirus interruptus* expuesta al aire, se bloquea la eliminación de amoníaco, dando origen a la acumulación del mismo principalmente en el compartimiento extracelular. El efecto de temperatura,

provoca que el animal aparentemente, utilice algún otro compartimiento para almacenar temporalmente el amoniaco, siendo esto una hipótesis que se tendría que demostrar en lo posterior. La posibilidad de que a la acumulación de amoniaco se acoplara la síntesis de AA como proceso de detoxificación es prácticamente nula.

Por otra parte, aun cuando es evidente la acumulación de amoniaco en hemolinfa, no se observó mortalidad en los animales a ninguna de las dos temperaturas. Es decir, no se llegó a provocar niveles tóxicos siendo mejor la capacidad de regulación de amoniaco a 7 °C que a 20 °C. Es posible que durante las primeras 7 horas a 20 °C, el animal pueda regular la concentración de amoniaco interna, y después de este período de tiempo ya no pueda hacerlo. Por ello que sería recomendable que estos animales no se expusieran por mas de 7 h al aire a 20 °C.

3.5. BIBLIOGRAFIA

- Bradford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing of protein dry binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Chen, J. C. y Chen, J. S. 1998. Acid-base balance, ammonia and lactate level in the haemolymph of *Penaeus japonicus* during aerial exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* **121A**, 257-262.
- Claybrook D. L. 1983. Nitrogen Metabolism. The biology of crustacea, Vol. 5. Academic Press.
- De Fur L. P., Pease A. y Elfers S. 1988. Respiratory responses of blue Crab *Callinectes sapidus*, to emersion. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **89**, 97-101.
- Durand F., Devillers, N., Lallier, F.H. y Regnault, M. 2000. Nitrogen excretion and changes in blood components during emersion of the subtidal spider crab *Maia squinado* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* **127**, 259-271.
- Durand, F., Chausson, F., y Regnault, M. 1999. Increases in tissue free amino acid level in response to prolonged emersion in marine crabs: an ammonia detoxifying process efficient in the intertidal *Carcinus maenas* but not in the subtidal *Necora puber*. *J. Exp. Zool.* **202**, 2191-2202.
- Durand, F. y Regnault, M. 1998. Nitrogen metabolism of two portunid crabs, *Carcinus maenas* and *Necora puber*, during prolonged air exposure and subsequent recovery: a comparative study. *J. Exp. Zool.* **201**, 2515-2528.
- Gomez-Jimenez, S. 1998. Some physiological and immunological responses of the spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall 1840) to practices used in its live marketing in the Baja California Fishery. Ph.D Thesis. University of Hull. England.
- Gomez-Jimenez S. Uglow R.F. y Hernandez-Lopez J. 1999. The effects of hypo and hyper-osmotic media on ammonia efflux rates and haemolymph constituent levels in the spiny lobster *Panulirus interruptus*. In: *Crustaceans and the Biodiversity Crisis*. (Eds. F. R. Scjram & J. C. Von Vaupel Klein). Pp 889-902. Leiden: Brill Academic Publisshers.

- Hosie D. A., Uglow R. F., Hagerman L., Sondergaard T. y Welle K. 1991. Some effects of hypoxia and medium ammonia enrichment on efflux rates and circulating levels of ammonia in *Nephrops norvegicus*. *Mar. Biol.* 273-279.
- Hunter D. y Uglow R. F. 1993. A technique for the measurement of total ammonia in small volume of seawater and haemolymph. *Ophelia*. 37 (1).
- Jiann-Chu Chen, Sha-Yen Cheng y Chung-Ting Chen. 1994. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem Physiol.* 109 A, 339-347.
- Kormanik, A. G. y Cameron, J. N. 1981. Ammonia excretion in animals that breathe water: a review. *Mar. Biol. Lett.* 2, 11-23.
- Mathews K.C. y Van Holde K.E. 1995. Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc. U:S:A: p. 1559.
- Morris, S., Greenaway, P. y MacMahon, B. R., 1995. Air Breathing by the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). Respiratory gas and acid-base status in response to emersion. *Physiol. Zool.* 69, 806-838.
- Morris S. y Oliver S. 1999. Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*: simulation studies of commercial shipping methods. *Comp. Biochem. Physiol.* 122, 299-308
- Regnault M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacean. *Biol. Rev.* 62, 1-24.
- Regnault M. 1992. Effect of air exposure on nitrogen metabolism in the crab *Cancer pagurus*. *J. Exp. Zool.* 264, 372-380.
- Regnault, M. y Durand F. 1998. Glycosaminoglycans in gills of an intertidal crab (*Carcinus maenas*): Changes in the GAG population in response to prolonged air exposure. *J. Exp. Biol.* 60, 167-181.
- Schmitt A.S.C. 1995. Aspect of the physiology of some crustacean species with particular reference their live marketing. Ph. D. Thesis. University of Hull. England.

- Schmitt, A. S. C. y Uglow, R. F. 1996. Haemolymph constituent levels and ammonia efflux rates of *Nephrops norvegicus* during emersion. *Mar. Biol.* **127**, 401-410.
- Vazquez-Ortiz F. A., Caire G., Higuera-Ciapara I, y Hernandez G. 1995. High performance liquid chromatographic determinations of free amino acid in shrimp. *J. Liquid Chromat.* **18**(10), 2059-2068.
- Weihrauch, D., Becker W., Postel, U. y Riestenpatt. 1998. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake. *J. Comp Physiol.* **168**, 364-376.
- Wheatly M.G., y Henry R. 1992. extracellular and intracellular acid-base regulation in crustaceans. *J. Exp. Zool.* **263**, 127-142
- Wright, J. C., Caveney S., O'Donnell, J.M. y Reichert J. 1996. Increases in tissue Amino acid levels in response to ammonia stress in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latr. *J. Exp. Zool.* **274**, 265-274.
- Wright, P. A., 1995. Nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* **198**, 273-281.