

9825.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

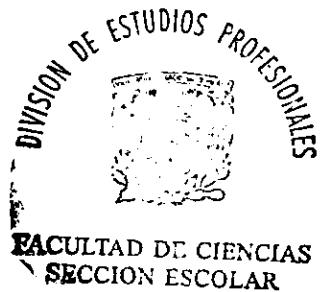
**EFFECTOS DE LA IRRADIACION Y EL FOTOPERIODO SOBRE LA
CONCENTRACION DE GLUTATION EN LA HEMOLINFA DE DOS
ESPECIES DE ACOCIL: PROCAMBARUS CLARKII Y
PROCAMBARUS DIGUETI.**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:**

INES RICALDE RECCHIA

**DIRECTOR DE TESIS:
JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO**

1 9 9 9



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

Matemática. Margarita Chávez Cano
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

“Efecto de la irradiación y el fotoperíodo sobre la concentración de glutatión en la hemolinfa de dos especies de acócil: *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*”

realizado por la alumna **Inés Ricalde Recchia** con número de cuenta **95550366-4**, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario **Biólogo. Julio Alejandro Prieto Sagredo**

Propietario **Dra. Ma. Luisa Fanjul Moles**

Propietario **Dra. Ma. Eugenia Gossebat Bonaparte**

Suplente **M. en C. Rosa Zugazagoitia Herranz**

Suplente **Dr. Emilio Rojas del Castillo**

Julio A. Prieto Sagredo
Ma. Luisa Fanjul Moles
E. Gossebat Bonaparte
R. Zugazagoitia Herranz
Emilio Rojas del Castillo

Edna M. Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz

A Mamá y Papá

A Nonna Elena

A Diego

A Carlos

A Nonno Humberto y Nonna Zoila

por hacer de mi vida un dulce y cálido sueño eterno...

Gracias...

Mamá... Por haberme otorgado la vida. Una vida que a tu lado ha sido profundamente feliz. De ti Mamá, he aprendido la fortaleza, la tenacidad, la disciplina y la pasión pero sobre todo la humildad y el amor hacia nuestros semejantes. Gracias Mamá por tu paciencia, tu tiempo, y tu amor incondicional.

Papá... Por esta mi vida. Por tu grandioso ejemplo y tu amistad sin fronteras, porque no me imagino sin tí, sin tus palabras, tus enseñanzas, tu apoyo y tu cariño. Por el corazón que hace algunos años engendraras y que siempre latirá al ritmo de tu imágen y tu amor.

Nona Elena... Por tu grandioso ejemplo, por demostrarme lo maravillosos que pueden ser todos y cada uno de los instantes de una vida. Por la chispa alegre y juvenil que me has contagiado y que eternamente llevaré conmigo como tu más preciada herencia.

Diego... Por los infinitos momentos felices que hemos compartido, por tu paciencia, comprensión y cariño, por tu apoyo técnico pero sobre todo por tu sonrisa juguetona y tu hermosa amistad.

Carlos... Por tu compañía, paciencia y comprensión. Por haber iluminado mis ojos y alma con la sonrisa cálida y eterna de las estrellas. Por acompañarme y ayudarme a construir una vida feliz, sencilla, divertida y tranquila. Por acercarme a tu mundo. Por los maravillosos momentos, experiencias, sueños y deseos que hemos compartido. Por tus consejos, tu amistad y tu cariño. Por estar a mi lado siempre. Por un futuro juntos. Por ser un fragmento eterno de mí.

Julio... Por tu amistad, tus enseñanzas y tu constante apoyo. Por la maravillosa forma en la que lograste que me enamorara de la ciencia y la investigación científica. Por tu mano dura y también por tus muy acertados regaños pero sobre todo por tu paciencia, tus consejos, tu calida sonrisa y tu cariño.

Manoel... Por haber encendido en mí corazón la chispa de la curiosidad y de la aventura científica, las cuales, se bien, formarán parte de mi siempre. Por las oportunidades, la paciencia y el incondicional apoyo. Por tu magnífica amistad querido gran maestro y amigo.

Mra. Eugenia... Por tu increíbe persona, por el espíritu de lucha que me inculcaste. Por tu apoyo, comprensión, paciencia y cariño. Por tu confianza, enseñanzas y por tu eterna sonrisa.

Dra. Mra. Luisa... Por haberme incluido en su maravillosa grupo de trabajo. Por su confianza, apoyo y cariño. Por transmitirme su pasión por la ciencia y la vida en general. Por sus consejos, su amabilidad, su tranquilidad y su hermosa amistad.

Rosa... Por los consejos y el apoyo que siempre, incondicionalmente, me has brindado y que han contribuido a engrandecer la confianza en mi misma y a enriquecer mi espíritu. Cuando pienso en la inteligencia, la amistad y el cariño tu imagen es la luz que inunda mi mente y mi corazón.

Emilio... Por tus enseñanzas, por el apoyo y la confianza incondicionales que tan cariñosamente me has otorgado. Por tu hermosa y tranquila persona.

Alejandra, Valentina, Gisselle, Liliana... Por la compañía, las sonrisas, el apoyo y la amistad que siempre me otorgaron. Por los hermosos momentos compartidos y por su cálido cariño.

Lupita... Por tu tranquilidad, tu paz y tu bella sonrisa. Por tu cálida amistad y por tu apoyo incondicional. Por una obra de arte que hoy y siempre llevaré conmigo, en lo más profundo de mi corazón. Por tu hijo.

Universidad Nacional Autónoma de México... Por tu cálida y hermosa hospitalidad. Por el regalo de tus vastos espacios. Por la oportunidad que me otorgaste de conocer a tanta gente maravillosa. Por los idiomas, los deportes, los jardines, las imágenes y la diversión pero sobre todo por permitirme ser parte de tu alma, de tu cuerpo y de tu corazón.

Al Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias. UNAM; A Fundación UNAM; a CONACYT (Proyecto 112-PN); a Fundación Telmex;; al Instituto de Biomédicas. Laboratorio de Genética; al Instituto de Materiales; a Intercambio Académico UNAM y a la Universidad de McGill... por la confianza, el reconocimiento y el apoyo.

A mis siempre amigos:

Oscar; Elsitá; Bety; Abud; Mary; Octavio; Claudia; Sonia; Hugo; Tere; Marce; Nadia; Marta; Sergio; Fernando; Rocio; Tere; Bety; Juan Carlos; Fausta; Iván; Paco; Edgar; Paco; Brenda; Andrea; Julio; Mario; Gastón; Raúl; Ma.Esther M.; Edna S.; Juan Carlos; Pilar; Horacio; Victor; Paty G.; Delfina; Paty; Mara; Jesús; Sr. Carlos C.; Gabriel; Omar; Rodrigo; Borri; Akemi; Amaya; Julie; Isidora; Manuel; Mariana; Patricio; Catherine; Norma; Emanuel; Livier; Gisela; Jorge; Marco; Edgar; Sra. María; Humberto; Olga; Todos mis Primos; Yago; Azúcar; Mecha; a mis Bebés... y a todos los que por falta de memoria he olvidado podido mencionar...

Por haber estado presentes en los momentos mas importantes de mi vida, por su apoyo, sus consejos y sus cariño...

Indice

<i>I. Resumen</i>	3
<i>II. Introducción</i>	4 -5
<i>III. Antecedentes</i>	6
1.- Generalidades acerca del acocil	
a. El acocil. Hábitat, hábitos e importancia	6 - 7
b. Ubicación taxonómica	7
c. Información general acerca de las especies estudiadas	7 - 8
2. Morfología Funcional y Anatomía	
a. Tagmosis y estructura	8
b. Metabolismo y respiración	8 - 9
c. Mecanismos respiratorios	9 - 10
d. Órganos respiratorios y la fisiología de la respiración en los crustáceos	10 - 11
e. Estrés y metabolismo en crustáceos	11
f. Aparato digestivo	11 - 12
g. Alimentación	12
h. Aparato circulatorio	12 -13
j. Recepción de estímulos y Sistema Nervioso	
Sistema Nervioso en el acocil	13
Recepción sensorial	13 - 14
Anatomía del lóbulo óptico de Crustáceos	14
Retina	14 - 15
Pigmentos accesorios	15
k. Sistema Endócrino	15 - 16
Figuras 1,2 y 3	17 -19
3.- Estrés	
a. Definición	20
b. Respuesta biológica al estrés	20 - 21
4. La luz y los organismos	
a. Efectos biológicos de la luz sobre el metabolismo animal	21
b. Estrés foto-oxidativo	21
c. Efectos de la luz sobre el metabolismo de los crustáceos	21-22
5.- Oxígeno	
a. Gas crucial para la vida	22
b. Factores que regulan el consumo de oxígeno	22 -23
c. El oxígeno como un tóxico	23- 24
6.- Glutacion	
a. Antecedentes históricos	24

b. Nomenclatura	24 - 25
c. El Glutación como antioxidante	25 - 26
d. Funciones principales del GSH	26 - 27
e. Efectos de la deficiencia de GSH	27 - 28
f. Glutacion en plasma sanguíneo	28
g. Glutación y retina	28
Figura 4. Ciclo de oxido-reducción del glutación	29
IV. Planteamiento y justificación del problema	30
V. Hipótesis	
a. general	31
b. particulares	31 -32
VI. Objetivos	
a. general	32
b. particulares	32
VII. Material y Método	
a. Organismos y mantenimiento en el laboratorio	33
b. Condiciones Experimentales	33 -34
c. Determinación de los parámetros de luz	34
d. Toma de muestras	35
e. Determinación de Glutación (GSH)	35
f. Análisis de Resultados	36
Figuras 5,6 y 7	37-39
VIII. Resultados y Discusión	
a. Mortalidad	
Resultados y discusión	40
Figuras 8 y 9	43
b. Niveles basales de GSH	
Resultados y discusión	40 - 42
Figuras 10 y 11	44
c. Efecto de la irradiancia y fotoperíodo sobre la especie <i>P. clarkii</i>	
Resultados y discusión	45 - 47
Figura 12 y tablas 1-3	48 - 49
d. Efecto de la irradiancia y fotoperíodo sobre la especie <i>P. digueti</i>	
Resultados y discusión	50 - 52
Figura 13 y tablas 4 - 6	53 - 54
e. Discusión General	55 -58
IX. Conclusiones	59
X. Perspectivas	60 - 62
XI. Literatura citada	63 - 68

Resumen

*Creo que podría transformarme y vivir
con los animales. ¡ Son tan tranquilos y mesurados !
Me complace observarlos largamente.
No se afanan ni se quejan de su suerte.
No se despiertan de noche con el remordimiento de las culpas.
No me aburren discutiendo sus deberes con Dios.
Ninguno está descontento, a ninguno le enloquece la
manía de poseer cosas.
Ninguno venera a los otros, ni a su especie, que cuenta
con miles de años de existencia.
Ninguno es respetable ni desgraciado
en toda la ancha Tierra.*

Walt Whitman

I. Resumen

La luz es un factor ambiental que induce cambios metabólicos en los organismos y si es recibida en exceso provoca alteraciones fisiológicas que son conocidas como estrés. El glutatión es un tiol que se sintetiza y es excretado, en los vertebrados, por tejidos como el hígado y los riñones y en los invertebrados por el hepatopáncreas. Su actividad se ha conectado a varias funciones que incluyen, entre otras, la catálisis del metabolismo y la disminución del daño que las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas dentro del mismo organismo, provocan. Es por lo tanto un buen indicador de los niveles de estrés provocados, por ciertos factores ambientales, en una gran variedad de plantas y animales, ya que su variación se debe, en parte, al exceso de las ROS, las cuales a su vez son producto de una situación estresante como puede ser la alteración de ciertos parámetros lumínicos como el fotoperíodo y la irradiancia.

El objetivo de este trabajo fue el de investigar si las alteraciones en los parámetros lumínicos, arriba mencionados, afectan los niveles de glutatión en la hemolinfa de las especies de acocil *P. digueti* y *P. clarkii*. Para ello organismos de aquellas dos especies, en estado de intermuda, se separaron en tres lotes: el primero sometido a fotoperíodo e irradiancia controles, el segundo a fotoperíodo 12:12 de alta y baja irradiancia y el tercero a fotoperíodo 20:04 también a alta y baja irradiancia. Una vez a la semana y para cada uno de los grupos y condiciones, se determinó la concentración de glutatión por el método de fluorescencia que utiliza o-ftalaldehído (OPT). Los resultados muestran incrementos, estadísticamente significativos, en la concentración de glutatión cuando los lotes son sometidos a los distintos fotoperíodos e irradiancias. Alcanzándose concentraciones tan altas como 1300 y 1100 ng/ml/gr en *P. clarkii* y *P. digueti* respectivamente. Estos resultados parecen indicar que en condiciones extremas de luz se afectan las concentraciones de glutatión de manera similar a la observada en otros invertebrados sometidos a otras fuentes de estrés ambiental como es el caso de los contaminantes ambientales (Nies et al., 1991).

II. Introducción

Todos los organismos y entre ellos los crustáceos han desarrollado diferentes estrategias fisiológicas y conductuales para adaptarse a los cambios drásticos que ocurren en sus ambientes y los cuales les generan cierto grado de estrés. Ejemplos de algunas de estas estrategias son, por ejemplo, la búsqueda de nuevos habitats en donde no existan peligros y cambios ambientales ó la inhibición de las conductas reproductivas en ambos sexos; de manera más específica ocurre, también, la disminución e incluso la detención total del metabolismo durante períodos de tiempo, mas o menos largos. Esto último con el objetivo de poder sobrevivir a las condiciones ambientales extremas, las cuales podrían ser letales. Los acociles están incluidos en el grupo de los crustáceos decápodos, ellos suelen vivir en cuerpos de agua donde existe agua corriente, por lo que presentan generalmente tasas metabólicas superiores a los organismos que viven en aguas estancadas. En nuestro país existen varias especies entre las que se encuentran algunas endémicas como es el caso de *Procambarus digueti*. Esta es una especie que habita medios fundamentalmente aerobios en la región central de México, los cuales en las últimas décadas se han visto seriamente afectados debido a que los ríos de esta zona, si no están contaminados por agroquímicos y otros productos, son utilizados para el abastecimiento de agua tanto para el campo como para las ciudades. A todo lo anterior se agrega el hecho de que de esta especie se ha estudiado poco y no se conoce mucho tanto de su ecología como de su fisiología. Por el contrario existen especies procedentes de regiones templadas e introducidas a México como lo es *Procambarus clarkii*. Ésta y a diferencia de *P. digueti* posee una alta capacidad de adaptación a los diferentes habitats y pudiera comenzar a desplazar a la primera especie, como resultado de su capacidad para resistir condiciones no del todo favorables en cuanto a la disponibilidad de oxígeno en los cuerpos acuáticos y otros parámetros ambientales. Debido a lo anterior se podría considerar a *P. digueti* como un organismo indicador de aguas bien oxigenadas, mientras que *P. clarkii* no constituiría una especie centinela en este tipo de ambientes (Fanjul-Moles et al., 1998). Se sabe que los cambios ambientales inducen respuestas adaptativas en los organismos, por lo tanto el estudiar y comprender los cambios inducidos por la variación en ciertos parámetros ambientales en estas dos especies de crustáceos permitiría conocer el alcance y/o la gravedad de las alteraciones a nivel del ambiente a las que estos organismos se enfrentan (Prosser, 1991).

Por otra parte es sabido que la luz es un factor ambiental que influye de manera importante en las funciones de los organismos, puesto que éstos están regulados directa o indirectamente por los cambios de luz que ocurren, no tan solo diariamente sino también estacionalmente y que son debidos a los movimientos de translación y rotación de la Tierra. Bajo condiciones naturales los organismos presentan patrones rítmicos en numerosos y diferentes procesos fisiológicos. Un gran número de animales y plantas presentan distintos tipos de ritmos biológicos y numerosas investigaciones han sugerido que aquellos están determinados por relojes internos, los cuales juegan un papel muy importante en la fisiología y el comportamiento tanto de las plantas como de los animales (Aréchiga, 1983).

El papel de la luz como determinante de alteraciones metabólicas, no ha sido estudiado tan a fondo como el efecto de otros factores ambientales tales como la disponibilidad de agua, los iones inorgánicos, la contaminación y la temperatura, entre otros. El efecto de la luz es relevante dados los cambios ambientales que actualmente sufren nuestros ecosistemas, como es el caso de la intensa deforestación, la cual modifica bruscamente las condiciones de iluminación a las que están sometidas las especies que los habitan.

Por otra parte, las investigaciones acerca de cómo el ambiente y las diferentes condiciones de vida inducen estrés en los animales, pueden ser aplicadas no solo en la cría intensiva, sino también para comprender las necesidades espaciales y sociales de los animales mantenidos en zoológicos, laboratorios e incluso en las mascotas. Sin embargo, la aplicación mas importante de estos estudios es, quizá, la de entender como es que las condiciones ambientales alteradas afectan a las especies naturales.

Antecedentes

*“Querer es una gran cosa, porque la Actividad
y el Trabajo son consecuencia generalmente
de la Voluntad, y casi siempre el Trabajo
va acompañado del Éxito.
Trabajo, Voluntad y Éxito
llenar la vida de un hombre.
La Voluntad abre las puertas
del Éxito con brillantez y felicidad;
el Trabajo hace pasar a través de esas puertas,
y al final del viaje el Éxito
corona los esfuerzos realizados”*

Luis Pasteur

III. Antecedentes

1.- Generalidades acerca del acocil

a. El acocil. Hábitat, hábitos e importancia

Los acociles pertenecen al orden Decapoda el más grande de los crustáceos. Este orden posee 1200 géneros y 10,000 especies; la mayoría marinos. El único decápodo de agua dulce perteneciente al grupo de Macrura-Reptantia (cangrejos de cola larga) es el acocil. A este organismo se le encuentra frecuentemente en el norte de América y se localiza en diferentes hábitats: pantanos, ciénagas, lagos y lagunas de agua dulce.

Estos animales se caracterizan por ser bentónicos y suelen estar mejor adaptados para reptar que la mayor parte de los camarones. El cuerpo tiende a estar aplanado dorsoventralmente. Las patas son gruesas y el primer par son unos poderosos quelípodos. Los pleópodos no están adaptados para la natación. Por lo general, los acociles y las langostas reptan, aunque para escapar a toda velocidad se desplazan hacia atrás mediante poderosas flexiones ventrales del abdomen y del telson.

Durante las primera etapas de vida postembrionaria, estos organismos viven principalmente en cuerpos acuáticos de aproximadamente un metro de profundidad. Conforme van creciendo migran hacia las partes someras que llegan a tener 3 cm de profundidad. Una vez alcanzada su talla definitiva, estos animales se concentran en zonas donde hay mayor vegetación, con el fin de ocultarse de los depredadores. Estos organismos suelen tener su mayor actividad durante la noche.

Los acociles forman un componente integral de los ecosistemas de agua dulce y cuando se presentan en abundancia, pueden ejercer daño en la vegetación, además de que la fabricación de madrigueras y la depredación de otros invertebrados, son algunas de sus conductas mas dañinas (Momot et al., 1978).

Estos organismos se ven muy afectados por los metales pesados y la contaminación por pesticidas y también por actividades humanas tales como los drenados y la canalización de ríos. Su uso como centinelas para detectar la contaminación por metales pesados ha sido recientemente propuesta y documentada (Nies et al., 1991).

En todo el mundo, los acociles han atraído por siglos la atención de científicos, políticos y gastrónomos. Esto último ha ampliado en las últimas décadas la cantidad de información y publicaciones acerca de estos organismos, debido a que el acocil es el macroinvertebrado más grande de los ecosistemas de agua dulce templada.

Además, estos organismos son comunes, como objeto de estudio, también entre los fisiólogos de invertebrados, en particular de aquellos que se dedican a trabajar con sistemas neuromusculares. *P. clarkii* es al parecer el acocil que con más frecuencia se ha estudiado y sobre el cual se han hecho el mayor número de investigaciones. Por el contrario la especie *P. digueti* no ha sido tan ampliamente estudiada.

b.- Ubicación taxonómica

Los decápodos, a los cuales pertenecen las especies que se estudian en este trabajo, se diferencian de otros malacostráceos porque sus tres primeros pares de apéndices torácicos están modificados como maxilípedos. Los cinco pares restantes de apéndices son patas, de lo cual se deriva el nombre decápoda (diez patas).

Se reconocen dos superfamilias de acociles, la Astacoidea con dos familias y la Parasitoidea con una sola familia. De las tres familias de acociles, la Astacidae y la Cambaridae habitan en el Hemisferio Norte, mientras que la Parastacidae está confinada al Hemisferio Sur. Todas las familias se distribuyen en zonas templadas.

Existen doce géneros dentro de la familia Cambaridae, once de los cuales se pueden encontrar en el norte de Mesoamérica. La nomenclatura de los géneros se basa principalmente en la morfología de los gonopodios sexualmente maduros del macho denominados petasmas. Clasificación (Holdich y Lowery, 1988).

Reino Animal

Rama Arthropoda

Clase Crustacea

Subclase Malacostracea

Superorden Eucarida

Orden Decapoda

Infraorden Astacoidea

Superfamilia Astacoidea

Familia Cambaridae

Género *Procambarus*

Especie *Procambarus clarkii*

Procambarus digueti

c. Información general acerca de las especies estudiadas

Procambarus clarkii

Procambarus clarkii es participante de importantes cadenas alimenticias y se extrae comercialmente para el consumo humano. Existe, por lo tanto, un doble interés en *P. clarkii* como una especie para el análisis ambiental ya que, por un lado, puede funcionar como biosensor debido a su capacidad de acumular contaminantes y por el otro representa una fuente importante de tóxicos para el humano u organismo que la consume (Nies et al., 1991)

En México *P. clarkii* es una especie introducida que proviene de regiones de alta latitud. Es una especie invasora ya que puede vivir en ambientes tanto aerobios como anaerobios y se sabe que ha llegado a sustituir a especies endémicas (Hogger, 1988)

P. clarkii ha sido encontrada en hábitats como lo son estanques y cuerpos de agua con corriente muy lenta. Es una especie excavadora y normalmente se distribuye de los 59° a los 28° N de latitud (Huner, 1988). Para este trabajo *P. clarkii* fue colectado en una localidad cercana a Ciudad Jiménez en Chihuahua, México (altitud 2345 m, latitud 27° N).

Procambarus digueti

Procambarus digueti, es endémico, de latitudes más bajas (19°) que la especie anterior, localizándose en regiones ecuatoriales y tropicales de la parte central de la República Mexicana. Es considerada como la especie más anciana de México y se caracteriza por habitar cuerpos de agua poco profundos y bien oxigenados. Las características del primer par de pleópodos del macho, forma I, indican que tienen poca afinidad con las otras especies de *Procambarus* (Villalobos, 1983). Con respecto a esta especie y a diferencia de *P. clarkii* existe escasa información tanto ecológica como fisiológica debido a su escaso valor comercial y a su limitada distribución.

2.-Morfología Funcional y Anatomía.

a. Tagmosis y estructura.

Los acociles tienen el plan corporal típico de los grandes crustáceos y son muy similares a otros malacostráceos de agua dulce en lo que respecta al desarrollo directo.

Dorsalmente el cuerpo del acocil se divide en dos regiones, la anterior, que es el cefalotórax, y la posterior, que es el abdomen (Figura 1). Como todos los malacostráceos este animal presenta 20 segmentos corporales y su tagmosis es la siguiente: un par de anténulas, un par de antenas, la mandíbula, maxilulas, maxilas, tres pares de maxilípedos, cinco pares de pereiópodos, de los cuales los tres anteriores son quelados y los cuatro posteriores están adaptados para caminar, cinco pares de pleópodos, un par de urópodos y el telson, que es postsegmental. En los machos el primero y segundo par de pleópodos están modificados para la cópula (Holdich y Reeve, 1988).

Los acociles están cubiertos de un exoesqueleto relativamente delgado y flexible, compuesto de una epticutícula y una procutícula, el cual cambian o mudan, cada cierto tiempo para permitir el crecimiento del organismo.

b. Metabolismo y respiración.

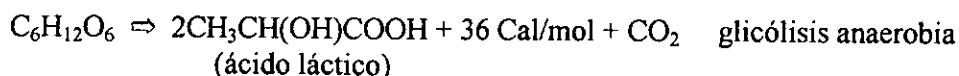
La respiración externa se refiere a todos aquellos mecanismos por los cuales el oxígeno es convertido en bióxido de carbono y expulsado del organismo; la respiración interna o metabolismo intermedio se refiere a la suma de reacciones enzimáticas, tanto oxidativas como no oxidativas, por las cuales un tipo de energía, generalmente la de los alimentos,

es transformada en otra que pueda ser utilizada para hacer trabajo biológico. El metabolismo puede ser expresado en términos de oxígeno consumido, de calor producido o de bióxido de carbono liberado (Prosser, 1991).

c. Mecanismos respiratorios

El oxígeno es necesario para proveer de energía a los procesos vitales y la disponibilidad de este gas impone límites en la distribución y la sobrevivencia de los animales. Algunos microorganismos obtienen energía exclusivamente por medios anaerobios, pero todos los organismos superiores y las plantas son aeróbicos o bien anaeróbicos facultativos, es decir que pueden obtener energía de la glucosa también en ausencia de oxígeno, produciendo ácido láctico como producto final. El anterior es un fenómeno que ocurre comúnmente en los invertebrados parásitos, excavadores (Schroff et al., 1980) o intersticiales (Schick et al., 1988).

Lo anterior se debe a que si todos los organismos tuvieran que obtener su energía exclusivamente de la oxidación aerobia su actividad locomotora se vería limitada y muchos de los ambientes les impondrían severos límites. Por lo tanto la vida sin oxígeno es posible si son usadas fuentes de energía no oxidativas. La anaerobiosis estricta, común entre las bacterias, es rara entre la mayoría de los animales, pero la mayoría de ellos pueden usar alguna ruta no oxidativa para la producción de energía y excretar u oxidar los productos resultantes. El metabolismo anaerobio o glicólisis no oxidativa produce menos energía y resulta en productos incompletamente catabolizados, si se lo compara con la glicólisis aerobia u oxidativa. Las reacciones químicas que a continuación se presentan hacen evidente lo anterior.



La glicólisis anaerobia, generalmente produce ácido láctico, el cual puede ser excretado, oxidado o bien pasar a formar parte de otros compuestos. Por ejemplo, del ácido láctico producido por muchos animales anaerobios una pequeña parte es oxidado después de la anaerobiosis, mientras que el restante es reconvertido a carbohidratos, generalmente glucógeno. En la oxidación anaeróbica de los ácidos y otros intermediarios, es liberado bióxido de carbono sin la necesidad de oxígeno.

Variaciones importantes en las vías glicolíticas anaerobias con respecto a las aerobias, se pueden observar sobre todo en las últimas etapas del proceso respiratorio. En éstas el ácido pirúvico en el metabolismo oxidativo es descarboxilado y transformado en CO_2 y AcetilCoA el cual, posteriormente, entra al ciclo de Krebs. Por el contrario durante la anaerobiosis, el ácido pirúvico es reducido para formar ácido láctico, el cual es excretado o bien en la presencia de oxígeno es completa ó parcialmente oxidado, ó incluso puede llegar a ser reconvertido en oxígeno. Como bien podrá observarse en las reacciones presentadas anteriormente, del metabolismo aerobio se obtiene mucha mas

energía que del anaerobio, ya que el primero produce 38 ATPs y el segundo tan solo 2 o bien 686 y 36 Cal/ mol respectivamente (Prosser, 1991).

d. Órganos respiratorios y la fisiología de la respiración en los crustáceos

La ventilación de los crustáceos acuáticos ocurre a través de las branquias, su número por segmento torácico generalmente es de cuatro, aunque esto es variable entre las diferentes especies (McLaughlin, 1983). Las branquias de los acociles han sido estudiadas tanto desde el punto de vista estructural como funcional (McMahon, 1986). El intercambio gaseoso no puede llevarse a cabo a través del exoesqueleto y es por ello que se lleva a cabo en la superficie de las branquias. Ellas poseen una gran superficie, una cutícula delgada y un aporte de sangre constante y abundante.

Los acociles crean, para su más eficiente respiración, corrientes de agua. Estas corrientes respiratorias son creadas por el batir de los exopoditos maxilares o escafoñatitos. En *Astacus astacus* se ha reportado que el escafoñatito bate aproximadamente 90 veces en un minuto a 15 °C. (McDonald et al., 1977).

La ventilación en estos y otros organismos, se estimula cuando ocurre una disminución en la presión parcial de oxígeno (PO_2). Un ejemplo para confirmar lo anterior es el hecho de que cuando al acocil *Astacus* se le disminuyó el oxígeno de 6.6 a 2.1 ml/litro se observó un incremento de tres veces en su tasa de respiración y se duplicó el volumen de su ventilación (McMahon, 1986).

Muchas especies de acociles pueden vivir fuera del agua por largos períodos de tiempo, debido a que, ellos pueden extraer el suficiente oxígeno para sobrevivir de sus compartimentos branquiales, siempre y cuando el aire que se encuentre en ellos posea la humedad suficiente. Esta capacidad es importante para especies cavadoras como lo es *Procambarus clarkii* que puede sobrevivir varios meses en cuevas o túneles con bajos niveles de oxígeno. Si el oxígeno alcanza presiones parciales muy bajas, los acociles suelen emerger para llenar sus cámaras branquiales con aire fresco. Algunos acociles australianos son considerados, debido a sus comportamientos y a sus hábitats sumamente hipóxicos, como organismos terrestres (Rogers et al., 1985)

La respiración de los crustáceos, así como la de muchos otros animales, comprende tres fases principales. Los primeros procesos ocurren por la necesidad de eliminar el bióxido de carbono y la necesidad aeróbica de oxígeno gaseoso. Segundo, los problemas del intercambio de gases entre el animal y su ambiente, así como entre la sangre, las tráqueas y los tejidos, establecen otro tipo de relaciones funcionales. Finalmente otro punto a considerar es el mecanismo interno para transportar el oxígeno y el bióxido de carbono desde las superficies respiratorias hasta la sangre, los órganos, los tejidos y finalmente el protoplasma de las células en donde y en particular dentro de las mitocondrias, se lleva a cabo el metabolismo como tal (Wolvekamp et al., 1960).

Las cantidades de oxígeno y de bióxido de carbono que intervienen en el proceso respiratorio dependen de dos factores: 1) del substrato metabólico y sus productos finales y 2) de la tasa metabólica. El segundo factor depende de un número considerable de variables tanto internas como externas. Debido a esto último los valores en el

consumo de oxígeno son sumamente variables no solo entre diferentes especies de crustáceos, sino también entre los individuos de una misma especie que se caractericen por ocupar hábitats con distintas condiciones de temperatura o que ellos mismos sean de diferente tamaño y sexo, que posean diferentes hábitos o bien que se encuentren en etapas distintas del ciclo de muda y bajo distintas condiciones ambientales que puedan o no ser estresantes para ellos.

e. Estrés y metabolismo en crustáceos

Se ha reportado que situaciones estresantes, en particular la referida a ciertos parámetros lumínicos, provocan en los crustáceos y en particular en el acocil una elevada producción de ácido láctico, lo cual indica que los organismos, como parte de sus estrategias adaptativas a dicho estrés, provocan un cambio interno en sus vías respiratorias pasando del metabolismo aerobio al anaerobio (Fanjul-Moles et al., 1998). Como producto de lo anterior el metabolismo general del organismo se ve alterado y por lo tanto sus mecanismos de defensa, sufren también ciertos cambios.

f. Aparato digestivo

El canal alimenticio es el aparato más grande de la cavidad del cuerpo de los acociles. La mayor parte del canal está rodeado y protegido por una capa interna de músculo longitudinal y otra capa externa de músculo circular y puede ser dividido en cuatro componentes: intestino anterior o estomodeo; intestino medio, un hepatopáncreas y el proctodeo, formando este último el 67 % de la longitud del intestino. El intestino anterior y el posterior están protegidos por una cutícula que es sustituida en cada muda; mientras que el epitelio del hepatopáncreas y el intestino medio no están protegidos. La boca que se abre por arriba de las mandíbulas, está bordeada por el labrum. Aquella se abre en un esófago muscular corto y vertical el cual se conecta a su vez en una gran cámara: el estómago o proventrículo que se divide en un canal anterior o cardias y uno posterior o pilórico. Los nombres que se les dan a las partes del estómago y a la glándula digestiva son para algunos autores erróneos, ya que consideran que ellos están dados haciendo una analogía con las estructuras de los vertebrados. Debido a ello a la glándula digestiva normalmente se le conoce como hepatopáncreas (Dall et al., 1983).

El hepatopáncreas es un órgano compacto y trilobulado formado por una gran cantidad de ductos y túbulos. Ocupa gran parte del volumen del cefalotórax y está en íntimo contacto con la hemolinfa. Interviene en la síntesis y la secreción de enzimas, en el metabolismo de los carbohidratos, la producción de emulsificantes, la excreción, el almacenaje de calcio y de ciertos metales pesados además de que es el sitio más importante para la síntesis y excreción del glutatión (Monier, 1936)

Las proteinasas, peptidasas, lipasas y amilasas que se encuentran en los fluidos digestivos, son derivados de las células del hepatopáncreas. Además mucha de la comida digerida es absorbida por las células del hepatopáncreas. En *Oreonectes limosus* mucho del alimento digerido es absorbido por las células del hepatopáncreas mientras que tan solo el 5% es absorbido por el intestino medio (Speck et al., 1970).

En la especie *P.clarkii* el hepatopáncreas juega un papel fundamental en el metabolismo del GSH y por lo tanto en la protección de los efectos negativos de ciertos agentes contaminantes como es el caso del cadmio (Cd^{2+}) el cual, es removido por el GSH evitando así que dicho metal dañe a las células de los organismos (Almar et al., 1987). El estudio anterior aunado a otras observaciones han demostrado la sensibilidad del hepatopáncreas de *P.clarkii* a diferentes contaminantes (Nies et al., 1991), por lo que se le ha propuesto como una especie marcadora de la contaminación ambiental (Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, 1975).

Finalmente puede decirse que el hepatopáncreas es un órgano sumamente versátil y algunas de sus funciones están bajo control neuroendócrino.

g. Alimentación

Los decápodos exhiben una amplia variedad de hábitos alimenticios y consumen diversos tipos de alimento, aunque en su mayor parte combinan la alimentación herbívora con la ingestión de carroña. La importancia relativa de los dos hábitos varía según la especie y también según el alimento disponible. Casi todas las especies dulceacuícolas y terrestres así como algunas formas marinas, son hervíboras.

h. Aparato circulatorio

El sistema circulatorio del acocil es de tipo abierto, las arterias que salen del corazón irrigan directamente a senos y lagunas y no existen venas como tales para regresar la hemolinfa al corazón. (Mainard, 1960). El corazón del acocil se sitúa por debajo de la división cardíaca del caparazón. Éste es un saco único, muscular, de una sola cámara hexagonal y está suspendido en un seno pericárdico por seis ligamentos conocidos como la *alae cordis*.

La hemolinfa el líquido corporal de los crustáceos contiene una proteína conocida con el nombre de hemocianina, la cual es la responsable del transporte de oxígeno a través de todos los tejidos y órganos de los crustáceos. Usualmente la hemolinfa incluye dos componentes, el plasma y los corpúsculos. Su volumen es variable pero generalmente representa entre el 10 y el 48% del peso corporal (Ragnekar, 1954). El volumen de hemolinfa no es constante durante el crecimiento ya que al parecer éste decrece a medida que el volumen de los tejidos incrementa (Drach, 1939).

La hemolinfa es bombeada al abdomen por medio de una arteria dorsal que emerge de una arteria bulbosa situada en la cavidad pericárdica, de esta última otra esternal pasa ventralmente a la izquierda del intestino y atraviesa el cordón nervioso ventral entre el tercero y el cuarto ganglio torácico. Esta última se conecta con las arterias ventrales torácica y abdominal. Después de varias divisiones todas las arterias se abren a un espacio hemocelómico que rodea a la mayoría de los órganos. La hemolinfa eventualmente se colecta en un gran seno esternal que se encuentra debajo del sistema torácico del endofragma para posteriormente ser llevada, mediante el bombeo del corazón, a las branquias donde el intercambio gaseoso se lleva a cabo. Esto último

requiere de una actividad coordinada del corazón y del escafoñatito, siendo que los dos responden directamente a la tensión de oxígeno en la sangre.

Algunas especies de acocil, frecuentemente, experimentan niveles muy bajos de oxígeno en sus ambientes, particularmente si son excavadores. En esas circunstancias ellos suelen abandonar aquel ambiente hostil o compensar aquellos niveles tan bajos de oxígeno. Se ha observado que *Austropotambius pallipes* migra, de aguas someras e hipóxicas a 15 °C al aire y se mantienen voluntariamente expuestos a esta última condición por largos periodos de tiempo. El resultado de lo anterior es una acidosis muy marcada en la hemolinfa, debida a la acumulación de bióxido de carbono y ácido láctico; sin embargo el pH retoma sus valores normales cuando el animal vuelve a sumergirse (McMahon, 1986).

La especie *Orconectes rusticus* posee un tipo de receptores sensitivos en las branquias, los cuales le permiten detectar la presencia de agua hipóxica en las cámaras branquiales. La respuesta a las condiciones hipóxicas consiste en incrementar el flujo de sangre y el batido del escafoñatito, que incrementa el flujo de agua entre las branquias. Algunas especies de acocil son consideradas terrestres ya que se hallan bien adaptadas para respirar aire (McMahon, 1986).

i. Recepción de estímulos y sistema nervioso

Sistema nervioso en los acociles

El sistema nervioso del acocil adulto es ganglionar, está formado por dos cordones nerviosos ventrales que unen varios ganglios en forma de escalera, estos son: el ganglio cerebroide ó supraesofágico, el ganglio subesofágico, cinco ganglios torácicos y seis ganglios abdominales; de cada ganglio se desprenden los nervios que innervan los diferentes apéndices y los órganos que componen cada uno de los segmentos corporales de estos organismos (Figura 2). El ganglio cerebroide se divide en tres regiones: a) el protocerebro, que innerva la región óptica; b) el deutocerebro, que innerva a las antenas y c) el tritocerebro, que innerva antenas e intestino (Mainard, 1965).

Con el fin de poder entender de una mejor manera los mecanismos involucrados en la recepción, transducción y transmisión de los estímulos luminosos a los que estos organismos suelen estar sujetos, a continuación se presentará una breve descripción de la anatomía del sistema nervioso central de los acociles.

Recepción sensorial

Todas las especies animales son sensibles de distintas formas a los cambios del medio ambiente y a los cambios que ocurren en su propio organismo. Desde niveles muy inferiores de la escala filogenética se han desarrollado estructuras especializadas para el procesamiento de modalidades específicas sensoriales y a éstas se les ha denominado órganos sensoriales o receptores sensoriales. El mecanismo de transducción de la información sensorial involucra la adecuación de una forma de energía, fotones en la retina, energía mecánica en la cóclea, etc., a la de energía bioeléctrica y a este proceso se asocia el de codificación neuronal, que es el paso de la información desde los

receptores hacia las fibras aferentes primarias y de estas al sistema nervioso central (Eckert y Randall, 1995).

Anatomía del lóbulo óptico de crustáceos

El acocil presenta ojos de tipo compuesto, pedunculados, localizados en la posición anterodorsal del cuerpo y separados por el rostro. La córnea del adulto es de aproximadamente 60 μM de ancho. Posterior a aquella se localiza la retina, por debajo de la cual se encuentra un espacio vascular, al que le sigue un neurópilo al que se le ha llamado lámina ganglionaris. En seguida se encuentran tres neurópilos bien definidos: los cuales son: la médula externa, la médula interna y la médula terminalis (Mainard, 1962).

En el adulto la lámina ganglionaris y las médulas están constituidas por una región fibrosa central formada por fibras nerviosas, glía y algunas neuronas, conocido como neurópilo y una región periférica formada por células nerviosas con diferentes características, como las neurosecretoras de tipo I (presentan gránulos de 1000-1700 A de diámetro) o las de tipo II (contienen gránulos de 1500-2000 A). En posición anterior y hacia un costado de la médula terminalis, aparece el cuerpo hemielipsoidal, que es un neurópilo glomerular.

Hay dos quiasmas, el externo que se encuentra entre la médula externa y la interna, y el interno que se localiza entre la médula interna y la terminalis; entre la médula externa y la interna, se encuentra un conjunto de terminales axónicas, rodeada de senos venosos, la glándula sinusal y hacia la región frontal lateral interna de la médula terminalis está el órgano-X constituido por células neurosecretoras, cuyos axones terminan formando la glándula sinusal; por último, de la médula terminalis sale el tracto óptico, ó también llamado nervio óptico, que llega al ganglio cerebroide (Sandeman, 1990). (Figuras 3 a y 3b)

Retina

La retina está compuesta por 2500 omatidias, que son las unidades básicas de la fotorrecepción. Los fotorreceptores son células sensibles a la luz y son las encargadas de transducir la información luminosa que los organismos reciben del medio que los rodea convirtiéndola en información eléctrica que, posteriormente, viaja directo hasta el cerebro.

Cada omatidia es un elemento óptico individual en el que las estructuras especializadas en la absorción de luz se encuentran en el centro (Shaw et al., 1982). La superficie externa de cada omatidia está cubierta por una córnea, ésta forma el límite óptico entre el medio ambiente líquido o gaseoso y el medio acuoso que constituye el cono cristalino, este cono es la estructura óptica que conduce la luz hacia las células fotorreceptoras. La luz incidente, después de pasar a través de la córnea y el cono cristalino, es absorbida por el rabdomero. Los rabdomeros, a su vez, están formados por miles de invaginaciones de la membrana de las células retinulares conocidas con el nombre de microvilli o microvellosidades. Cada omatidia se forma de ocho de aquellas células; las microvellosidades de siete de ellas (R1-R7), forman un rabdomo central constituido por la unión de los rabdomeros individuales, la octava célula retinular no contribuye al rabdomo principal, sino que forma un rabdomo pequeño, que probablemente actúa como un filtro de luz, antes de que ésta llegue al rabdomo

principal. El rabdomo es una estructura especializada de captación de fotones (Nassel, 1992). Los axones de las células retinulares, que están rodeados de senos venosos, se extienden hacia la membrana basal por debajo de la cual se encuentra la lámina ganglionaris.

Pigmentos accesorios

El rabdomo principal contiene altas concentraciones de un pigmento fotosensible, la rodopsina, el cual puede ser convertido por ciertas longitudes de onda (500-600 nm) a metarrodopsina, también fotosensible. El pigmento que se encuentra en el rabdomo accesorio presenta una sensibilidad que se ha asociado a la luz azul y particularmente al violeta (Goldsmith, 1972).

Otro tipo de pigmentos accesorios son: el pigmento proximal, que está en las células retinulares; el pigmento distal en las células pigmentarias distales; y un pigmento reflector de la luz, en las células del pigmento reflejante. A éstas últimas también se les llama células del pigmento secundario o células del tapetum, y están situadas en la membrana basal (Page et al., 1975).

Los cambios de sensibilidad a la luz-obscuridad de los componentes oculares son el resultado de procesos fotoquímicos, neurales y fotomecánicos. En las omatidias las adaptaciones fotoquímicas y neurales están relacionadas intrínsecamente con propiedades de las células retinulares y con otras células extrarretinulares. La adaptación fotomecánica principal incluye ciertos cambios morfológicos en células retinulares así como movimientos reversibles de gránulos de los pigmentos accesorios. Cuando los animales están expuestos a la luz, los pigmentos se dispersan a lo largo de la omatidia evitando la entrada de luz, y cuando el animal se encuentra en obscuridad se retraen permitiendo su entrada. Así, la redistribución de los pigmentos accesorios contribuye a controlar la apertura del campo de visión de cada omatidia (Goldsmith, 1972).

j. Sistema endócrino

En los crustáceos muchos de los procesos fisiológicos y del desarrollo están bajo el control de las hormonas (Cooke et al., 1982). El sistema endócrino de los acociles produce tres tipos de hormonas: a) las neurohormonas; b) las hormonas de las glándulas epiteliales como lo es la glándula Y; la glándula androgénica y las ováricas y c) las feromonas.

Entre la médula externa y la interna, hacia la región lateral externa, se encuentra un conjunto de terminales axónicas rodeada de senos venosos, la glándula sinusal, y hacia la región frontal lateral interna de la médula terminalis está el órgano-X constituido por un conjunto de células neurosecretoras, cuyos axones terminan formando la glándula sinusal.

La glándula sinusal y el órgano-X, constituyen el órgano de almacenamiento y de liberación, respectivamente, de las neurohormonas responsables de la regulación de las funciones metabólicas que permiten la adaptación ambiental; como la regulación de azúcar en la hemolinfa, la adaptación a la luz o la muda, entre otras (Rudolph et al., 1990).

Además estas estructuras se han propuesto como regiones fundamentales para la regulación de la posición de los pigmentos retinianos y tegumentarios, la muda e incluso de algunos ritmos circadianos.

De manera mas específica es sabido que la glándula sinusal interviene en las respuestas metabólicas de estos organismos, ya que contiene una substancia que incrementa la concentración de glucosa en la hemolinfa. Hace tiempo se le dio el nombre de factor diabético (Abramowitz et al., 1944) y sin embargo hoy es conocida con el nombre de hormona hiperglicémica de crustáceos (CHH).

Es conocido que la estimulación de los procesos de muda está bajo el control de una hormona producida en el órgano Y, formado, éste último, por un par de glándulas epiteliales y localizado en la base de cada maxila. Los órganos Y son también necesarios para el desarrollo de los ovarios y producen las hormonas que determinan las características sexuales de las hembras tanto permanentes como temporales.

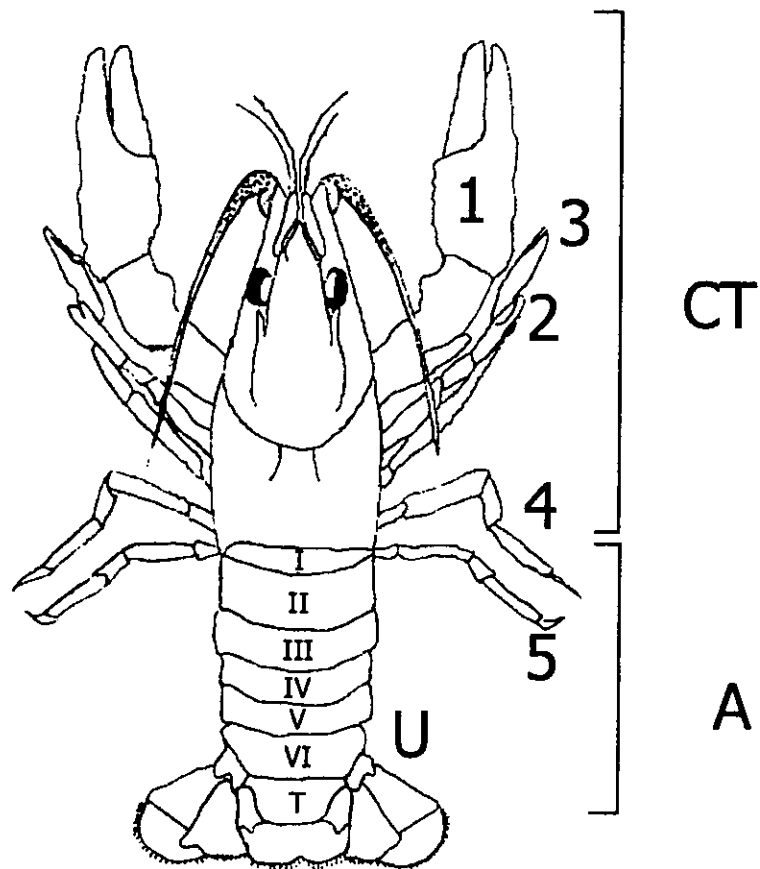


Figura 1.- Esquema de la tagmose del acocil. CT, cefalotórax; A, abdomen; 1-5, pereopodos; I-VI, segmentos abdominales debajo de los cuales se localizan los pleópodos; U, urópodos; T, telson.

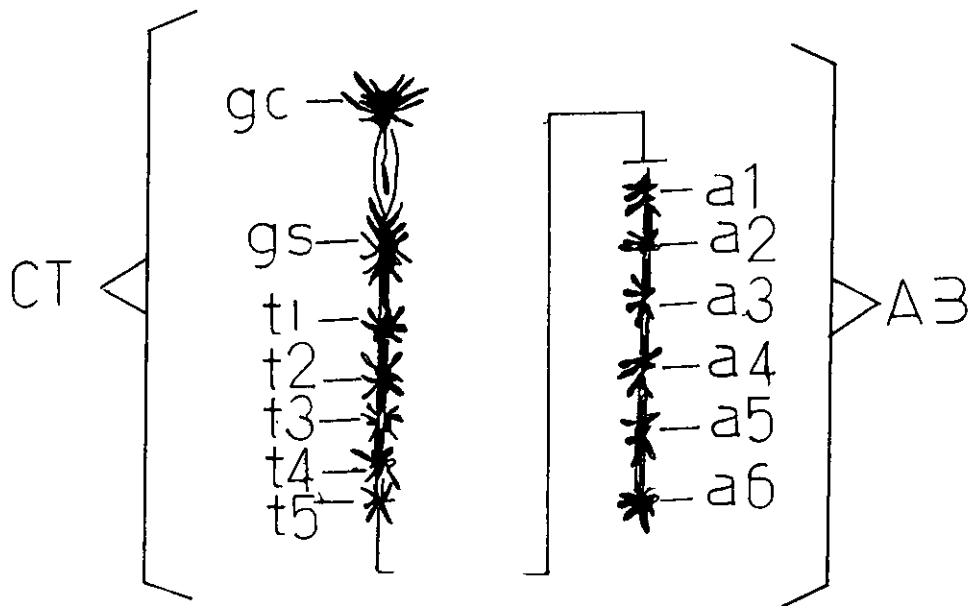


Figura 2. Esquema de la cadena ganglionar en el acocil. CT, cefalotórax; AB, abdomen; GC, ganglio cerebroide; GS, ganglio subesofágico; T1-T5, nervios torácicos 1 a 5; A1-A6, nervios abdominales 1 a 6. (Redibujado de Sandeman, 1982).

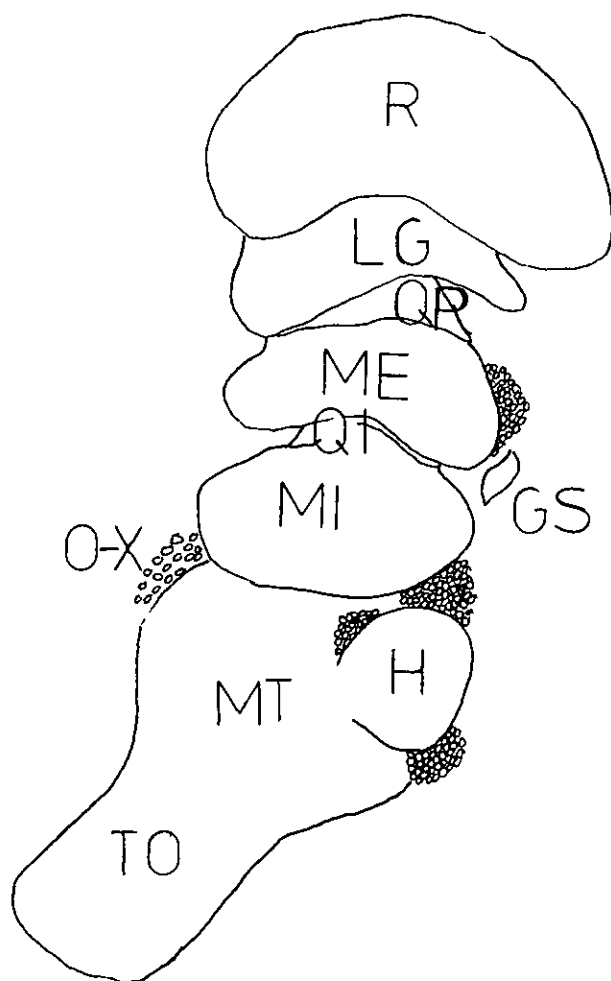


Figura 3 a.

Figura 3a.-Esquema del lóbulo óptico del acocil adulto. R, retina; LG, lámina ganglionaris; QE, quiasma externo; QI, quiasma interno; MI, médula interna; MT, médula terminalis; TO, tracto óptico; GS, glándula sinusal; O-X, órgano X; H, cuerpo helipsoidal (Redibujado de Sandeman et al. 1988).

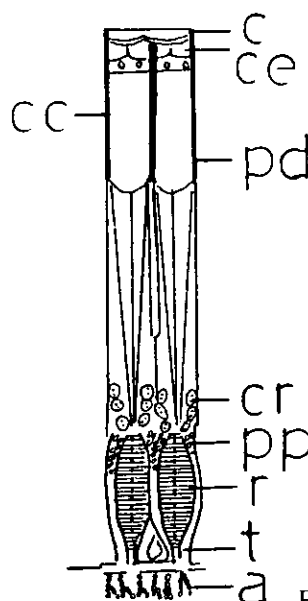


Fig.3b

Figura 3b. - Esquema de omatidia. c, córnea; ce, células corneógenas; cc, células del cono cristalino; pd, pigmento distal; pp, pigmento proximal; cr, núcleos de las células retinulares; r, rabdomo; t, células del tapetum; mb, membrana basal; a, axones de las células retinulares. (Redibujado de Waterman, 1961)

3.- Estrés

a. Definición

El estrés ó Síndrome de la Adaptación General es la prolongada capacidad que posee un organismo de adaptarse a una fuente de daño potencial o desequilibrio homeostático.

Existen tres sentidos en los que el termino estrés ha sido utilizado: el primero, se refiere a la tensión aplicada a un organismo; el segundo, para describir las respuestas fisiológicas que se producen como respuesta a esa fuerza y el tercero, en un contexto fisiológico, para describir la capacidad de convivir con ciertos eventos ambientales.

En la biología y la psicología, el termino estrés ha sido utilizado de muy diversas maneras. Quizá la más sencilla se explique con la analogía de un pedazo de metal al cual se le aplica una cierta fuerza, si esta última es demasiada se provocará una deformación en el metal que puede ser cuantificada. Implícita en esta analogía se encuentra la idea de que aquel estrés puede llegar a ser intolerable; llegando a un punto máximo, por lo que se asume que un organismo que sufre de algún tipo de estrés severo puede sufrir un daño fisiológico sumamente importante.

b. Respuesta biológica al estrés

Para que un animal pueda sobrevivir, debe de ser capaz de mantener su ambiente interno dentro de ciertos límites que están generalmente determinados por su información genética. Un estímulo externo que desafíe a la homeostasis puede ser visto como un factor estresante y los cambios en las funciones biológicas que ocurren cuando el animal intenta mantener su homeostasis constituyen la respuesta del animal a dicho estrés. El animal, debe, por lo tanto, ser capaz de distinguir que estímulos provocan una alteración a la homeostasis y entonces hacer los ajustes necesarios a su maquinaria biológica, la cual proveerá de la mejor defensa en contra del daño que se le está provocando.

Un ejemplo de respuesta biológica al estrés, en organismos superiores, es el incremento en la secreción de glucocorticoides por parte de la corteza de las glándulas suprarrenales. De manera mas precisa, lo que sucede cuando el organismo se enfrenta a una situación estresante es que en la hipófisis anterior se produce una mayor cantidad de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) la cual actúa activando a la corteza de la glándula suprarrenal. Los glucocorticoides secretados por esta última glándula ejercen su acción sobre el hígado en donde se aumenta la síntesis de las enzimas que promueven la gluconeogénesis (síntesis de glucógeno a partir de sustancias distintas a los carbohidratos). La glucosa es liberada provocando un incremento de sus concentraciones en la sangre, lo cual puede ser utilizado en los órganos y tejidos que lo requieran para solventar el estado de estrés en el que se encuentran. En el caso de los crustáceos las situaciones estresantes producen la activación de la glándula sinusal, lo cual, a su vez, provoca que la secreción de hormona hiperglicémica (CCH) se incremente y por lo tanto lo hagan los niveles de glucosa en la hemolinfa.

De esta manera y cuando se consideran los efectos de los estresantes ambientales, las respuestas del cuerpo, que incluyen la movilización de energía pueden, en la mayoría de los casos, ser vistos como una preparación para la reparación del peligro o del daño físico.

Por lo tanto, soportar o convivir con una situación peligrosa es de hecho la función de las respuestas fisiológicas que constituyen la reacción de estrés. Todas las respuestas que se observan ya sean fisiológicas o conductuales pueden ser vistas como adaptativas debido a que ellas tienden a minimizar y/o eliminar casi cualquier tipo de condición ambiental anormal ó daño al que pueda estar sujeto un determinado organismo.

4.- La luz y los organismos

a. Efectos biológicos sobre el metabolismo animal

La sensibilidad a la energía electromagnética de longitudes de onda que van desde el ultravioleta hasta el infrarrojo es una función adaptativa de los crustáceos y en general de casi todos los organismos que habitan este planeta.

A pesar de ello la luz, como un agente estresante que afecte las funciones normales de un organismo y que por lo tanto limite su distribución, ha sido poco investigado. A pesar de lo anterior, es claro, que bajo condiciones naturales, los animales están sometidos a numerosas variaciones ecológicas como lo son por ejemplo: las diferencias en la temperatura del agua en la que viven y la concentración del oxígeno disuelto en ella, así como también a cambios constantes de la cantidad e intensidad de luz que llega hasta los lugares donde suelen refugiarse (Seligier et al., 1965).

b. Estrés foto-oxidativo

La producción de ROS (especies reactivas de oxígeno, reactive oxygen species por sus siglas en inglés) debido a la luz se conoce como estrés foto-oxidativo. Éste último puede ocurrir de dos maneras: 1) por la donación de energía o de electrones al oxígeno como resultado de la actividad fotosintética (en las plantas) ó 2) como resultado de la exposición de los tejidos a la luz ultravioleta (Foyer et al., 1994).

De las dos anteriores es la última la que más nos interesa ya que los organismos con los cuales trabajamos también se enfrentan al tipo de radiación antes mencionada.

Los autores arriba citados sugieren, también, que la foto-oxidación ocurre con mucha mas intensidad cuando el organismo se enfrenta a otros tipos de estrés como lo son: la contaminación ambiental ó por pesticidas y las bajas temperaturas. Lo anterior provoca una serie de alteraciones en el metabolismo haciendo que niveles normales de luz resulten excesivos.

c. Efectos de la luz sobre el metabolismo de los Crustáceos

En cuanto a los crustáceos se ha reportado que la tasa metabólica del acocil parece ser afectada por cambios en la temperatura y concentración de oxígeno, pero la influencia de la luz en los parámetros metabólicos de la clase Decapoda ha sido desde siempre un tema muy controversial. Se han reportado, por ejemplo, cambios importantes en el consumo de oxígeno de ciertos cangrejos que fueron sometidos a diferentes longitudes de fotoperíodo, mientras que efectos no significativos de esta variable sobre la tasa metabólica del acocil *Orconectes nais* también fueron reportados (Rice et al., 1974). A pesar de ello, se sabe, que la actividad de los acociles está regulada por la presencia o ausencia de luz y que tanto la muda como la reproducción, al parecer, están reguladas por el fotoperíodo (Penn, 1943). Finalmente habría que añadir que un efecto más de este importante parámetro ambiental, es la inducción que éste tiene sobre la tasa de crecimiento y la maduración gonadal, en particular en la especie de acocil *Procambarus clarkii* (Castanón-Cervantes et al., 1995).

5.- Oxígeno.

a. Gas crucial para la vida

La evolución química comenzó cuando la Tierra poseía una atmósfera reductora y la síntesis temprana de compuestos orgánicos ocurrió bajo condiciones anaeróbicas. Así, el metabolismo aeróbico siguió al anaeróbico y el primero aunque menos universal es más eficiente. Algunos microorganismos aún obtienen su energía exclusivamente por metabolismo anaeróbico pero todas las plantas y animales lo hacen aeróbicamente aunque conservan algunas de las enzimas de las vías anaeróbicas. (Prosser, 1991)

Algunos animales cambian, por breves períodos, de un metabolismo aeróbico a uno anaeróbico (como los animales que respiran aire y que en ciertas ocasiones bucean, los que realizan un ejercicio muy intenso o los que caen en períodos de anoxia). Ha sido observado que algunos animales después de un período de hipoxia, muestran un incremento en el consumo de O_2 para restituir la deuda metabólica.

Ciertos animales, después de un período de anaerobiosis, muestran un incremento en el consumo de oxígeno en proporción ó incluso mayor que el déficit acumulado y no excretan nada de los ácidos acumulados. Otros pagan, sólo en parte la deuda de oxígeno y otros no la pagan y excretan todos los ácidos formados durante aquel periodo de anaerobiosis. La capacidad de acumular los productos finales del metabolismo anaerobio representa una adaptación importante de los animales expuestos durante largos períodos de tiempo a condiciones de anoxia frecuentes.

Frecuentemente, sucede también que los animales sobreviven largos períodos de anaerobiosis en una relativa inactividad y cuando se restablecen las concentraciones normales de oxígeno se vuelven hiperactivos, lo cual incrementa su consumo de oxígeno. Este comportamiento también ha sido observado en invertebrados (Ross, 1983).

b. Factores que regulan el consumo de oxígeno.

La tasa en el consumo de oxígeno de los organismos está influenciada por la temperatura, el tamaño del cuerpo, el momento en el ciclo de vida, la estación y la hora del día, así como por el fotoperíodo y la herencia.

Muchos organismos muestran ritmos diurnos y lunares en el consumo de oxígeno, que persisten en condiciones de laboratorio cuando se mantienen controladas la temperatura, la luz y la presión.

El fotoperíodo también puede afectar el metabolismo. Se reportó que *Pachygrapsus* en un período de 8 hrs de luz consume 55% más oxígeno que cuando se encuentra en uno de 16 hrs y en ciertos peces el consumo de oxígeno fue mayor cuando se hallaban en un período de luz de 9 hrs que cuando se sometieron a uno de 15 (Whitemore et al., 1960).

c. El oxígeno como un tóxico

Los animales poseen elaborados mecanismos para prevenir que el O₂ celular sea demasiado bajo. De manera contraria, un daño celular puede también ocurrir cuando existe un exceso de oxígeno. Cuando se elevan los niveles de oxígeno se produce daño celular, que en ocasiones es irreversible (Tarr et al., 1993).

Las células pueden morir debido a la presencia de grandes cantidades de oxígeno. Por ejemplo algunos parásitos intestinales como *Ascaris* muere en 30 o 60 minutos si se le coloca en un ambiente con 100 % de oxígeno (Fox, 1955).

Además de los parásitos, muchos otros animales de vida libre que viven en regiones con baja concentración de oxígeno pueden ser sumamente afectados con concentraciones elevadas de este gas. Por ejemplo las larvas de los chironómidos (*C. plumosus*) y el ostracodo del género *Heterocypris* viven bien en un ambiente con oxígeno al 4%, resisten un tiempo más corto en uno con 21% y mueren en 2 o 3 días cuando son expuestos a un ambiente con 100% de este gas (Fox, 1955).

En el caso de los mamíferos, el tiempo para que murieran el 50% de animales sometidos a 1 atm de O₂ en las ratas fue de 3 días, en los ratones de 5, en los pollos de 9 y en las codornices de 14. Ciertos hamsters mantenidos en ambientes con niveles altos de O₂ mostraron degeneración retinal y daño en el epitelio germinal de los testículos. Las divisiones celulares de los protozoarios se detienen en ambientes con exceso de O₂. La gente que hace buceo y que respira O₂ puro muestra indudables signos de intoxicación por éste gas (Prosser, 1991).

Puede decirse que los efectos del oxígeno puro se parecen a aquellos de la radiación ionizante. La base de este supuesto se debe a que la ganancia de un electrón, es decir, la reducción del O₂, genera un super óxido (O₂⁻). El exceso de electrones puede provenir de varias fuentes, entre las que se encuentran las moléculas autooxidables como lo son las catecolaminas, las oxidorreductasas y de los organelos subcelulares como la mitocondria, el retículo endoplásmico, el núcleo y los cloroplastos (Prosser, 1991).

En todos los sistemas biológicos, el O_2^- sufre una segunda reducción, transformándose en una molécula de H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), la cual es dividida en dos radicales OH por la catalasa, una enzima. Las anteriores y otras formas de O_2 activado, constituyen lo que hoy se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS). Los radicales OH son una de las formas más reactivas que existen de los anteriormente mencionados ROS y entre sus efectos más deletéreos están: la oxidación de proteínas, del ADN, de los esteroides y la peroxidación de los lípidos no saturados de las membranas celulares. Algunos otros efectos celulares son la oxidación de las coenzimas sulfhidrilos tales como la CoA, la inactivación de las enzimas SH, la peroxidación de los lípidos y la oxidación de varios intermediarios que contengan grupos SH. Lo anterior es lo que se conoce como estrés oxidativo endógeno.

Para contrarrestar la presencia de los radicales libres, las células cuentan con una serie de antioxidantes como lo son el glutatión, las catalasas, la vitamina E, entre otros, cuya función fundamental es proteger los compuestos o moléculas, que contienen azufre, de la auto-oxidación.

6.- Glutatión

El glutatión es un péptido que provee a las células de un ambiente reductor, es un componente fundamental del sistema antioxidativo que defiende a la célula en contra de los efectos tóxicos del oxígeno y de muchas otras sustancias y moléculas tanto exógenas como endógenas (Dolphin et al., 1989).

a. Antecedentes históricos

El glutatión fue encontrado por primera vez por J. de Rey-Pailhade (De-Rey-Pailhade, 1888); esta "sustancia" a la cual él llamó philotión tenía la propiedad de hidrogenar a los sulfuros que entran al organismo y prevenía su oxidación (Meister et al., 1983; Larson et al., 1983).

En un principio se creyó que la sustancia (philotión) era un dipéptido compuesto por ácido glutámico y cisteína. En aquella época pudo establecerse que la sustancia era autooxidable y que actuaba en diversos momentos ya fuera como aceptor de hidrógeno ó de oxígeno.

Algunos años más tarde y después de numerosos análisis se llegó a la conclusión de que aquella proteína era un tripéptido constituido fundamentalmente por ácido glutámico, cisteína y glicina.

b. Nomenclatura.

El glutatión existe en cantidades variables en todos los tejidos y se puede encontrar en dos formas: reducida y en cuyo caso la fórmula esquemática es R-SH y oxidada ó R-S-S-R. Los términos glutatión reducido y glutatión oxidado son comúnmente expresados como GSH y GSSG, respectivamente.

El glutatión oxidado se forma por la unión de dos moléculas de GSH las cuales han donado o perdido sus hidrógenos, es decir: $GSH + GSH = GSSG + 2H$.

Ha sido reportado que en los tejidos de ciertos mamíferos, el glutatión está presente sobre todo en su forma reducida, en concentraciones que alcanzan hasta los 3100 $\mu\text{g/g}$ de tejido, mientras que el GSSG se encuentra en concentraciones mucho menores que van de 0 a 244 $\mu\text{g/g}$ de tejido (Tietze, 1969).

c. El glutatión reducido como antioxidante

El GSH es un tripéptido compuesto de tres aminoácidos: cisteína, ácido glutámico y glicina. Unidos, estos aminoácidos, proveen a la célula de un compuesto esencial que lleva a cabo una gran variedad de funciones como parte del sistema natural de defensa en contra de las ROS y de los radicales libres, los cuales como se mencionaba anteriormente son continuamente producidos en los tejidos de los organismos aeróbicos (Larson, 1983). Existen amplias evidencias de que el GSH tanto en invertebrados como en vertebrados es un importante protector en contra del estrés oxidativo, el cual, es producto tanto de fuentes endógenas, propias del organismo (Lash et al., 1986) como de aquellas exógenas tales como algunos componentes de la dieta y numerosos contaminantes ambientales.

Un exceso en la producción de estos radicales, en especial del altamente tóxico radical hidroxilo (OH), provoca un daño indiscriminado a la mayoría de las macromoléculas que constituyen a un organismo, entre las que se encuentran el ADN, las proteínas y los lípidos de membrana (Halliwell et al., 1992). Para resistir este daño, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidativos tanto enzimáticos como no enzimáticos. Los mecanismos no enzimáticos incluyen, entre otros, a las vitaminas E y C, al glutatión (Dylock, 1995) y a un gran número de quelantes de hierro como la ferritina (Halliwell et al., 1992), mientras que en las defensas enzimáticas se incluye a la superóxido dimutasa (SOD), a la glutatión peroxidasa (GSH-Px), la glutatión reductasa (GSH-Rd) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Singh et al., 1990).

La segunda y tercera de las enzimas mencionadas anteriormente intervienen en el ciclo REDOX del glutatión. La GSH-Px oxida al glutatión reducido cuando transmite el poder reductor del GSH a los peróxidos tóxicos endógenos o exógenos presentes en el organismo, mientras que la GSH-Rd restaura la condición del glutatión reducido.

De manera más específica, los radicales libres con la ayuda la enzima SOD (superóxido dimutasa) son unidos al agua dando como resultado la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El GSH o glutatión reducido es utilizado por la glutatión peroxidasa (GSH-Px), una enzima selenio-dependiente, para restarle poder oxidativo a los peróxidos de hidrógeno. En este proceso el poder oxidativo que estas moléculas poseen es transferido al glutatión oxidado o GSSG y aunque este último aún tiene un cierto poder oxidativo es significativamente mucho menor que el del peróxido de hidrógeno. El GSSG es reciclado por la enzima glutatión reductasa (GSH-Rd) usando una molécula de NADPH (dinucleótido de niacina-adenina-fosfato reducido). En este proceso, el NADPH es transformado a NADP^+ (la forma oxidada del NADPH) y así se regenera el GSH que puede volver a ser utilizado para restarle toxicidad al peróxido de hidrógeno y a otras especies reactivas de oxígeno. Para mantener este ciclo funcionando es necesario contar con ATP (adenosín trifosfato), es decir, con energía celular. Esta es utilizada para reducir el NADP^+ que se produce cuando los hidrógenos del NADPH son tomados para reducir al GSSG. (Figura 4)

El glutati3n como parte de la defensa antioxidativa interviene tambi3n en contrarrestar la peroxidaci3n de los l3pidos de membrana, que son resultado del estr3s oxidativo. Esta 3ltima situaci3n provoca la aparici3n de especies reactivas de ox3geno, generadas a su vez, por la utilizaci3n de v3as aer3bicas por parte de los organismos. El GSH, al actuar como un donador de hidr3geno, contribuye a la reducci3n de los per3xidos de hidr3geno sirviendo as3 ,como un mecanismo inhibidor y reparador del da3o provocado por la peroxidaci3n lip3dica.

d. Funciones principales del GSH

El GSH es un p3ptido multifuncional que adem3s de jugar un papel fundamental como antioxidante participa en otros procesos como lo son la s3ntesis de prote3nas y de los nucl3tidos, el transporte de las primeras, la actividad enzim3tica y la respiraci3n de las c3lulas (Meister et al., 1983). Esto 3ltimo lo realiza ya que mantiene el estado reducido del ascorbato, de los tocoferoles y de otras mol3culas con poder reductor. (Meister, 1988).

Actualmente se sabe que el glutati3n posee un papel importante en la inhibici3n de ciertas toxinas, en la coagulaci3n sangu3nea, en la reactividad de los antibi3ticos, en la permeabilidad celular, en la funci3n de las hormonas, en el metabolismo o la funci3n de la vitamina B₁₂ y en la incorporaci3n de sulfuro en ciertos tipos de melanina (Meister, 1983).

Numerosas investigaciones han conferido al GSH caracter3sticas protectoras y terap3uticas en contra de los da3os provocados por la radiaci3n o el c3ncer. Esta capacidad que posee el GSH y que no comparte con otros aminotioles se debe a la eficiencia particular del GSH para donar sus hidr3genos (Arrik et al., 1984). Se conjuga tambi3n con compuestos de origen ex3geno, con xenobi3ticos y con carcin3genos. Esto 3ltimo ocurre cuando al interior de la c3lula ocurre la combinaci3n del GSH con alguna de las anteriores sustancias por la acci3n de una enzima llamada glutati3n transferasa, posteriormente el conjugado es transportado al medio extracelular y ah3 es dividido en varias partes por otra enzima, la γ - glutamyl transpeptidasa (GGT). Se ha propuesto que lo anterior ocurre para promover la detoxificaci3n celular, haciendo que los compuestos da3inos posean una mayor solubilidad en el agua y por lo tanto que puedan ser excretados con mayor facilidad (Lieberman, 1996).

En el p3rrafo anterior se menciona que la enzima GGT es la encargada de separar en sus partes constitutivas al GSH conjugado con la toxina, pero tambi3n aquella enzima es de vital importancia para la c3lula ya que es la encargada de separar los amino3cidos que constituyen al GSH una vez que 3ste sale de la c3lula. De esta manera y una vez que la enzima act3a sobre el GSH, el glutamato es separado de la cisteina y la glicina (Griffith et al., 1979). En esta forma los amino3cidos pueden ser reabsorbidos por las c3lulas y ser utilizados en diversas procesos intracelulares o para la s3ntesis de nuevo GSH. Dicho de otro modo el GSH es tambi3n una fuente de amino3cidos, principalmente de cisteina. Se ha reportado que un decremento en la actividad de la GGT produce patrones extra3os de coloraci3n en el pelaje de las ratas y que esto se debe a que para la s3ntesis de la faeomelanina es necesaria la cisteina. Al aplicar NAC (N-acetyl-cysteina) los patrones extra3os de coloraci3n se revierten porque esta 3ltima sustancia es una fuente importante de cisteina (Lieberman, 1996).

La degradación del glutatión extracelular es necesaria para que se puedan mantener las concentraciones intracelulares de este mismo tripéptido que deben de ser elevadas para poder mantener un eficiente mecanismo de defensa en contra del daño oxidativo y las sustancias tóxicas tanto endógenas como exógenas que pudieran afectar a las células (Richman et al., 1975).

El glutatión participa también como un cofactor esencial y específico en la actividad de un gran número de enzimas, además de que la exportación del glutatión parece servir de protección a la membrana celular cuando se encuentra en ambientes oxidativos (Lieberman, 1996). Se ha sugerido también que el glutatión podría jugar un papel directo en el proceso de la neurotransmisión (Larson et al., 1983)

e. Efectos de la deficiencia de GSH.

Los defectos en la síntesis de éste péptido producen efectos deletéreos en la salud de los organismos. La glutatonuria y glutationemia son padecimientos que ocurren cuando se presentan decrementos en las concentraciones normales de GSH en órganos y tejidos, lo cual se ha reportado, produce cierto grado de retraso mental en los pacientes que lo sufren (Lieberman, 1996).

La deficiencia prolongada de GSH provoca también daños en las mitocondrias de las células, esto se debe a que es en aquellos organelos donde se lleva a cabo la respiración celular y donde se produce la mayor cantidad de ROS. Al ocurrir un decremento en los niveles de GSH, las ROS comienzan a ser extruidas del interior de las mitocondrias al citosol, con el consiguiente daño a muchos sino es que a todos los procesos que se llevan a cabo dentro de las células, lo cual no tarda en producir la muerte. Por otra parte y también debido al exceso de ROS ocurre en las mitocondrias una disminución en la producción de ATP, es decir, de las moléculas que le proporcionan energía a la célula (Martensson et al., 1991).

Los resultados de otros experimentos han revelado que la inhibición en la síntesis de GSH en ratas recién nacidas causa un incremento en las ROS lo que provoca daño oxidativo en músculo esquelético, en tejido pulmonar, renal y cerebral. Esto último y en caso de prolongarse la inhibición de la síntesis de GSH provoca la muerte de los organismos (Martensson et al., 1990). Como se menciona anteriormente el daño observado es debido a la destrucción de las mitocondrias, las cuales requieren de niveles adecuados de GSH para contrarrestar la formación de ROS que normalmente se producen en su interior.

Los resultados de diversos estudios sugieren que la inhibición de las enzimas que contribuyen a la formación del glutatión podría ayudar a que ciertas células sean más susceptibles a las radiaciones utilizadas en ciertas terapias contra los tumores. Se ha observado también, que al administrar drogas y radiaciones a ciertas células, se incrementan los niveles de glutatión y la susceptibilidad de aquellas decrece considerablemente. La resistencia a ciertos compuestos tóxicos, a la radiación y al daño oxidativo se puede incrementar en células normales elevando de alguna manera los niveles intra y extracelulares de glutatión (Meister, 1988).

Por otra parte se sabe que la deficiencia en la síntesis de GSH causa, en los humanos, disfunciones cerebrales que provocan diversas neuropatologías y una tendencia a la hemólisis (Meister, 1988). De lo anterior se deriva la importancia del estudio del glutatión y su ciclo, ya que conociendo más acerca de ello se podrán entender mejor algunas de las anomalías en el funcionamiento de las maquinarias, tanto metabólica como nerviosa de los organismos en general y del humano en particular.

f. Glutatión en plasma sanguíneo.

El transporte del GSH se lleva a cabo a través de la sangre de su lugar de síntesis a otros órganos y tejidos por lo que dicho tripéptido se encuentra también en el plasma sanguíneo. Sin embargo ha sido reportado que el glutatión intracelular tiene una concentración mucha más alta que el plasma (De Meyts et al., 1992).

El glutatión plasmático protege a las células del daño oxidativo. Cuando se produce una situación estresante el hígado incrementa la producción y exportación de GSH a la sangre. De hecho, se ha demostrado que los niveles de GSH plasmático se incrementan considerablemente después de haber realizado un intenso ejercicio físico y que a su vez el GSH hepático decrece. (Lew et al., 1985). Lo anterior sugiere que cuando ocurre una situación estresante el hígado incrementa su aporte de GSH a la sangre para que sea llevado a los lugares que lo requieren como podrían ser los músculos y el cerebro.

El GSH presente en el plasma sanguíneo puede ser blanco de las numerosas glutatión oxidasas que también se encuentran en la sangre. Sin embargo y a pesar de ello alrededor del 85% del glutatión total en la sangre se encuentra en su forma reducida (Meister et al., 1983).

g. Glutatión y retina

Debido a que los estímulos luminosos son captados, en la mayoría de los animales, por medio de los receptores visuales, es necesario mencionar que el GSH está presente también en la retina (Hermann et al., 1945) y que este tejido también posee actividad enzimática asociada con el metabolismo del glutatión, como es el caso de la enzima glutatión peroxidasa (Reim et al., 1974). Al igual que en otros tejidos, en la retina, el papel fundamental del GSH es el de proporcionar protección en contra del daño oxidativo (Barry et al., 1983). Los resultados de otros trabajos reportan que la reducción del GSH ocular está asociado con el desarrollo de cataratas (Martensson et al., 1991) y se cree que la excreción de grandes cantidades de GSH en el humor acuoso del ojo probablemente sirva para prevenir o reducir el daño que la luz pudiera producir en las lentes oculares (Martensson et al., 1995).

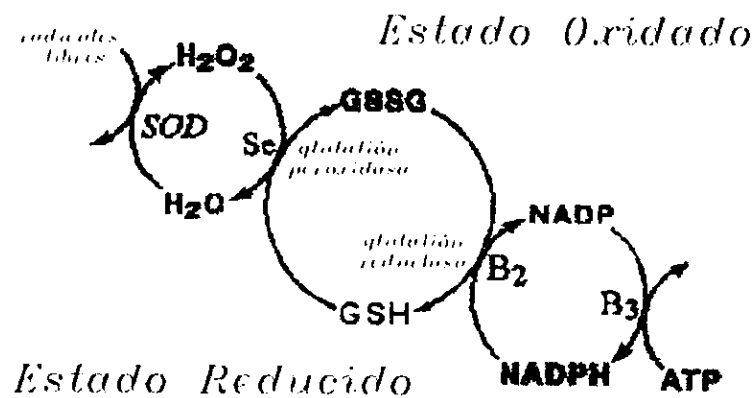


Figura 4.- Esquema que muestra el proceso de reducción y oxidación del glutatión (explicación en el texto).

GSH. glutatión reducido; **GSSG.** glutatión oxidado; **Se.** selenio; **H₂O₂** peróxido de hidrógeno; **SOD.** superóxido dimutasa; **NADPH.** dinucleótido de niacina-adenina-fosfato reducido; **NADP+.** forma oxidada del NADPH; **B2.** enzima que interviene en la oxidación del NADPH; **B3.** enzima que interviene en la reducción de el NADP+; **ATP.** adenosín trifosfato.

Planteamiento y
Justificación del
Problema

Hipótesis

y

Objetivos

*"Al buscar el conocimiento de la naturaleza,
podemos encontrar cosas tan radicalmente diferentes
a nuestra experiencia que pueden - con su inesperada existencia-
cuestionar nuestra propia realidad, nuestra misma esencia"*

Godfrey Sykes

IV.- Planteamiento y justificación del problema

Se conoce que tanto los factores biológicos intrínsecos como los ambientales extrínsecos desencadenan, en los animales, respuestas fisiológicas y genéticas al estrés mediante señales de transducción y vías REDOX.

Lo anterior así como la escasa información que existe acerca de los efectos de la luz sobre el metabolismo de los animales (en especial en los crustáceos) y los resultados obtenidos en un trabajo anterior (Fanjul-Moles et al., 1998) en el cual se analizaban las alteraciones que las características extremas de la luz provocan sobre el consumo de oxígeno, la producción de lactato y el comportamiento de la especie de acocil *Procambarus clarkii*, constituyen los antecedentes directos que sentaron las bases para el planteamiento y el desarrollo del presente trabajo.

Era evidente, al observar los resultados obtenidos en aquel trabajo, que de alguna manera las vías metabólicas de los organismos estaban siendo afectadas por las características extremas de la luz, produciendo una clara disminución en el consumo de O₂ y la activación del metabolismo anaerobio. Lo anterior nos llevó a buscar la manera de poder cuantificar, de manera más precisa, los efectos de estas últimas sobre el metabolismo del glutatión en las especies de acocil *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*. Esto último debido a que la variación en los niveles de aquel tripéptido parece ser un buen indicador del grado de estrés en el que se encuentran los organismos.

El glutatión, es un tripéptido que interviene en la regulación del metabolismo REDOX de casi todos los organismos (incluyendo a los crustáceos), y fue por ello que sus variaciones se eligieron como indicadoras del estrés foto-oxidativo que los organismos experimentaron como producto de las características extremas de luz que se analizaron: fotoperíodo e irradiancia. Lo anterior, debido a que ante una situación estresante, es sabido, que se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y otro tipo de radicales libres, por lo que la maquinaria de detoxificación debe de modificar de alguna manera su eficiencia.

Las especies estudiadas en el presente trabajo: *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*, fueron elegidas, debido a que poseen características distintas en cuanto a su distribución. La primera es una especie cosmopolita mientras que la segunda es endémica de la región central de la República Mexicana. Se propone que el estudio de los efectos de las características extremas de luz sobre el metabolismo de estas dos especies de acocil puede llevar a explicar, de una mejor manera, el por qué de su distinta distribución, resistencia y capacidades adaptativas. Además de que puede proporcionar valiosa información acerca de los efectos que pueden producir en la salud de éstos y muchos otros organismos las alteraciones en el ambiente, como es el caso de la deforestación, la cual trae como consecuencia cantidades e intensidades anormales de luz en los cuerpos de agua donde aquellos organismos suelen habitar.

A lo mencionado en los párrafos anteriores habría que agregar el hecho de que últimamente se ha incrementado el interés por conocer y entender mejor los sistemas antioxidativos tanto de los invertebrados como de los vertebrados debido a que ha sido reconocido que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son importantes en muchos

procesos biológicos que afectan desde la señalización intracelular hasta el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la longevidad de los organismos. Problemas específicos debido al estrés oxidativo han sido poco estudiados en los animales inferiores. Lo anterior aunado a la posibilidad de tener en ellos un modelo para investigación biomédica es un aliento interesante para continuar trabajando con ellos.

v. Hipótesis

Hipótesis General

Si al modificar los parámetros lumínicos: fotoperíodo e irradiancia, a los cuales están adaptados los acociles y por lo tanto al encontrarse aquellos ante una situación lumínica estresante, se observa una disminución en el consumo de oxígeno y un aumento en los niveles de lactato en la hemolinfa; entonces los niveles de glutatión se incrementarán como resultado del ambiente reductor que provoca la elevada concentración de lactato en la hemolinfa, producto, a su vez, de la respiración anaeróbica que se produce durante las condiciones lumínicas estresantes.

Hipótesis particulares

1.- Los niveles de GSH se incrementarán como consecuencia de que durante las condiciones estresantes y por lo tanto al ocurrir la respiración anaeróbica, se genera una deuda de oxígeno que es saldada una vez que la vía aeróbica es utilizada de nuevo (Ellington. 1983). Lo anterior provoca la existencia de un exceso de oxígeno el cual, al no ser utilizado para la obtención de energía a partir de los carbohidratos, es transformado, en radicales libres o ROS. Estos últimos poseen un poder oxidativo importante y peligroso, por lo que el aumento en los niveles de glutatión reducido (GSH) propuesto en el presente trabajo, permitiría a capturarlos y evitar el daño celular y tisular que aquellos pudieran provocar.

2.- Las ROS además de incrementarse como producto de la recuperación aeróbica después de un período en respiración anaeróbica podrían también ser producto de la foto-oxidación, es decir, que la luz, provocara la formación de radicales libres y ROS como resultado de la exposición de los tejidos a la luz ultravioleta (Foyer C. et al., 1994)

3.- Como producto de las alteraciones en los parámetros lumínicos de fotoperíodo e irradiancia, se espera que *P. digueti*, al ser una especie adaptada a un fotoperíodo ecuatorial, presente una tasa más elevada de mortalidad que *P. clarkii*, la cual se distingue por ser una especie que habita regiones en diversas latitudes y por lo tanto menos susceptible a los cambios de longitud en el fotoperíodo.

4.- Se espera que los niveles basales de glutatión en la hemolinfa de las especies analizadas difiera en sus valores debido a su distribución y a sus distintas capacidades adaptativas.

procesos biológicos que afectan desde la señalización intracelular hasta el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la longevidad de los organismos. Problemas específicos debido al estrés oxidativo han sido poco estudiados en los animales inferiores. Lo anterior aunado a la posibilidad de tener en ellos un modelo para investigación biomédica es un aliento interesante para continuar trabajando con ellos.

v. Hipótesis

Hipótesis General

Si al modificar los parámetros lumínicos: fotoperíodo e irradiancia, a los cuales están adaptados los acociles y por lo tanto al encontrarse aquellos ante una situación lumínica estresante, se observa una disminución en el consumo de oxígeno y un aumento en los niveles de lactato en la hemolinfa; entonces los niveles de glutatión se incrementarán como resultado del ambiente reductor que provoca la elevada concentración de lactato en la hemolinfa, producto, a su vez, de la respiración anaeróbica que se produce durante las condiciones lumínicas estresantes.

Hipótesis particulares

1.- Los niveles de GSH se incrementarán como consecuencia de que durante las condiciones estresantes y por lo tanto al ocurrir la respiración anaeróbica, se genera una deuda de oxígeno que es saldada una vez que la vía aeróbica es utilizada de nuevo (Ellington. 1983). Lo anterior provoca la existencia de un exceso de oxígeno el cual, al no ser utilizado para la obtención de energía a partir de los carbohidratos, es transformado, en radicales libres o ROS. Estos últimos poseen un poder oxidativo importante y peligroso, por lo que el aumento en los niveles de glutatión reducido (GSH) propuesto en el presente trabajo, permitiría a capturarlos y evitar el daño celular y tisular que aquellos pudieran provocar.

2.- Las ROS además de incrementarse como producto de la recuperación aeróbica después de un período en respiración anaeróbica podrían también ser producto de la foto-oxidación, es decir, que la luz, provocara la formación de radicales libres y ROS como resultado de la exposición de los tejidos a la luz ultravioleta (Foyer C. et al., 1994)

3.- Como producto de las alteraciones en los parámetros lumínicos de fotoperíodo e irradiancia, se espera que *P. digueti*, al ser una especie adaptada a un fotoperíodo ecuatorial, presente una tasa más elevada de mortalidad que *P. clarkii*, la cual se distingue por ser una especie que habita regiones en diversas latitudes y por lo tanto menos susceptible a los cambios de longitud en el fotoperíodo.

4.- Se espera que los niveles basales de glutatión en la hemolinfa de las especies analizadas difiera en sus valores debido a su distribución y a sus distintas capacidades adaptativas.

5. No se esperan diferencias en los niveles basales de glutatión reducido (GSH) en la hemolinfa de machos y hembras ya que la protección en contra de los efectos de las especies reactivas de oxígeno no tendría por qué presentar diferencias entre ambos sexos. El ambiente reductor generado por la respiración anaeróbica que ocurre durante el estrés debería también ser igual en ambos sexos.

VI. Objetivos

a. General

El objetivo de este trabajo fue el de observar y cuantificar el efecto de la variación en la longitud del fotoperíodo y la irradiancia extrema sobre los niveles del glutatión reducido (GSH) en la hemolinfa de los acociles: *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*, especies que se desarrollan y se han adaptado en distintos ambientes y latitudes.

b. Objetivos particulares

- 1.- Observar cual de los dos parámetros lumínicos que se alteraron (fotoperíodo e irradiancia) tiene un efecto más significativo sobre los niveles de GSH en la hemolinfa de las dos especies de acocil estudiadas.
- 2.- Caracterizar los valores basales de GSH en las especies de acocil *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*, debido a que no existen datos precisos y recientes de ello.
- 3.- Determinar si existen diferencias intraespecíficas en relación con la mortalidad y la variación en los niveles de GSH durante y después del estrés lumínico.
- 4.- Observar si existen diferencias significativas en los niveles basales de GSH en la hemolinfa de las especies trabajadas, así como también entre los sexos con el fin de poder explicar mejor su distinta distribución y capacidades adaptativas.

5. No se esperan diferencias en los niveles basales de glutatión reducido (GSH) en la hemolinfa de machos y hembras ya que la protección en contra de los efectos de las especies reactivas de oxígeno no tendría por qué presentar diferencias entre ambos sexos. El ambiente reductor generado por la respiración anaeróbica que ocurre durante el estrés debería también ser igual en ambos sexos.

VI. Objetivos

a. General

El objetivo de este trabajo fue el de observar y cuantificar el efecto de la variación en la longitud del fotoperíodo y la irradiancia extrema sobre los niveles del glutatión reducido (GSH) en la hemolinfa de los acociles: *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*, especies que se desarrollan y se han adaptado en distintos ambientes y latitudes.

b. Objetivos particulares

- 1.- Observar cual de los dos parámetros lumínicos que se alteraron (fotoperíodo e irradiancia) tiene un efecto más significativo sobre los niveles de GSH en la hemolinfa de las dos especies de acocil estudiadas.
- 2.- Caracterizar los valores basales de GSH en las especies de acocil *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*, debido a que no existen datos precisos y recientes de ello.
- 3.- Determinar si existen diferencias intraespecíficas en relación con la mortalidad y la variación en los niveles de GSH durante y después del estrés lumínico.
- 4.- Observar si existen diferencias significativas en los niveles basales de GSH en la hemolinfa de las especies trabajadas, así como también entre los sexos con el fin de poder explicar mejor su distinta distribución y capacidades adaptativas.

Material

y

Método

*“La Verdad es un fuego fatuo
que sólo puede ser captado con
la red de los que despreciándola
llevan a cabo pacientes experimentos”.*

Paul de Kruif

VII. Material y Método

a. Organismos y mantenimiento en el laboratorio.

El experimento fue llevado a cabo utilizando dos grupos de machos y hembras adultos de las especies *Procambarus clarkii* (Girard, 1982) (n=18) y *Procambarus digueti* (Ortman, 1905) (n=18) escogidos aleatoriamente.

Los primeros fueron colectados en el norte de México en Ciudad Jiménez, Chihuahua a una latitud de 28° N y los segundos en la parte central del país en Las Juntas (Cuamécuaro), Michoacán a una latitud de 19° N.

Todos los animales fueron de peso y tamaño homogéneo y se encontraban en estado de intermuda.

Antes de iniciar el experimento los organismos fueron aclimatados, durante un mes, en acuarios con fotoperíodo 12:12 (12 horas de luz y 12 de oscuridad) con una intensidad de luz de 0.02 - 0.03 luxes ($8.4 - 12.6 \times 10^{-5} \text{ W m}^{-2}$)* durante la fotofase, con una temperatura de 15°C, pH 7 y un promedio de nivel de oxígeno de 5.6 mg/l.

Para evitar el estrés por sobrepoblación, los 18 animales de cada especie fueron separados en grupos de 6 y dispuestos en tres acuarios distintos, teniendo cada uno de ellos las condiciones que arriba se mencionan, además de poseer cada uno un filtro biológico. La luz durante la fotofase provenía de lámparas de neón, las cuales eran reguladas por un timer y la irradiancia fue calibrada con un fotorradiómetro que poseía un sensor submarino (Licor Mods. LI 189 y LI 193SA).

b. Condiciones experimentales (Figura 5)

Para cada especie se dividió a los 18 animales en tres cajas con el fin de tener las tres condiciones experimentales con las que se trabajaría. De esta manera seis animales estuvieron en la primera caja llamada lote control, la cual se caracterizó por tener las mismas condiciones luminosas las diez semanas que duró el experimento, es decir, un ciclo de luz oscuridad 12:12 y baja intensidad de luz 0.043 W m^{-2} ($0.2 \mu\text{M s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) durante la fotofase.

La caja catalogada como lote 20:04 (20 horas de luz y cuatro de oscuridad) tuvo las siguientes condiciones: durante las primeras dos semanas el fotoperíodo fue de 12:12 con baja intensidad (condición control) (0.043 W m^{-2} ó $0.2 \mu\text{M s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$); posteriormente durante las semanas 3 y 4 el fotoperíodo fue cambiado a 20:04 pero se siguió conservando la luminosidad baja, a esta condición se le llamó experimental 1 (Exp1) de la caja 20:04. Durante las semanas 5 y 6 llamadas de reposo (Rec1) se regresó el fotoperíodo a 12:12 con baja intensidad de luz. Las semanas siguientes, es decir, la 7 y la 8 el fotoperíodo fue cambiado a 20:04 pero en esta ocasión se incrementó la intensidad de luz a 2.8 W m^{-2} ($13 \mu\text{M s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$), a esta condición se le llamó experimental 2 (Exp2) de la caja 20:04. El experimento se dio por terminado después de dos semanas de recuperación (Rec2) bajo un fotoperíodo de 12:12 con baja luminosidad.

* La irradiancia del sol más la del cielo es de 60 W m^{-2} ó $2000 \mu\text{M s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$

En la segunda caja, catalogada como lote 12:12, el ciclo luz oscuridad fue siempre de 12:12. Las primeras 6 semanas y las dos últimas la luz durante la fotofase fue de baja intensidad (0.043 W m^{-2} ó $0.2 \mu\text{M s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) mientras que durante las semanas 7 y 8 la intensidad de luz se incrementó a 2.8 W m^{-2} ($13 \mu\text{M s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$); a esta última condición se le llamó experimental 2 (Exp 2) de la caja con fotoperíodo 12:12. Las últimas dos semanas con baja intensidad fueron consideradas como de recuperación (Rec). (Figura 6)

En este punto habría que aclarar que la existencia de las primeras seis semanas en condiciones control, en el lote 12:12, se debe a que se debía respetar la secuencia y duración del experimento llevado a cabo en la caja 20:04, el cual como se vio dura 10 semanas ya que posee dos condiciones experimentales (2 semanas cada una) y por lo tanto dos períodos de reposo (2 semanas cada uno) además de las dos semanas iniciales.

c. Determinación de los parámetros de luz

Los fotoperíodos e irradiancias experimentales son el resultado de una serie de observaciones y mediciones realizadas en el campo.

Fotoperíodo

Para el fotoperíodo extremo se decidió aplicar veinte horas de luz y cuatro de oscuridad. Esto último para *P. digueti* representa un situación poco común ya que ellos y debido a que habitan en zonas cercanas al Ecuador, tienen períodos de luz de no más de 15 horas al día. Mientras que la especie *P. clarkii*, al habitar en regiones de mayor latitud está mejor adaptada a fotoperíodos largos, llegando a tener, en ciertas épocas del año, hasta 18 horas de luz al día. Fue debido a lo anterior que se decidió que un fotoperíodo extremo para ambas especies sería el de veinte horas de luz y cuatro de oscuridad; dejando al fotoperíodo 12 horas luz, 12 horas oscuridad como la condición control o normal.

Irradiancia

Los acociles son animales nocturnos, la luminosidad más intensa a la cual se someten ocurre al amanecer y al atardecer, aunque durante la estación reproductiva algunas especies se exponen a la luz del día.

Para fijar la irradiancia experimental se hicieron determinaciones de campo en el hábitat de la especie *P. digueti* (Zamora, Michoacán, México, altitud 1575m latitud, 19 °N) a diferentes horas del día. La irradiancia fue medida por medio de un sensor esférico submarino (Licor Mods. LI 189 y LI 193S) sumergido a 0.7 m de la superficie bajo áreas soleadas y sombreadas en un día no nebuloso. La irradiancia tuvo un intervalo de 0.002 W m^{-2} ($0.13 \mu\text{M s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) en el amanecer a 8.58 W m^{-2} ($39.5 \mu\text{M s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) a medio día.

Para *P. clarkii* el intervalo de irradiancia observado fue de 0.104 W m^{-2} ($0.48 \mu\text{M s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) al atardecer hasta 9.78 W m^{-2} ($45 \mu\text{M s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) en el mediodía.

Se tomó como valor control o normal el observado en las primeras horas del amanecer (0.043 W m^{-2} o $0.2 \mu\text{M s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) en las zonas donde suelen habitar estos organismos, es decir, bajo la vegetación que se observaba en los ríos o bien cerca de sus orillas y en donde los acociles suelen construir sus madrigueras o cuevas.

El valor que fue tomado como extremo para el caso de la irradiancia fue el que se registró al medio día en zonas iluminadas de los ríos, irradiancia a la cual, los acociles nunca se enfrentan (2.8 W m^{-2} ó $13 \mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$) debido a sus hábitos excavadores y nocturnos.

d. Toma de muestras (Figura 7)

En cada una de las semanas que duraba el experimento, el muestro se llevó a cabo siempre el mismo día y a la misma hora con el fin de evitar las variaciones tanto circadianas como semanales. El trabajo se hacía lote por lote, todos los animales de cada caja se introducían al congelador por diez minutos, con el objetivo de anestésarlos. Posteriormente, a cada animal, con un bisturí se les hacía una pequeña incisión en la parte ventral del pleón y con una micropipeta se extraían $40\mu\text{l}$ de hemolinfa. Una vez realizado lo anterior, la herida provocada en el organismo se cerraba con pegamento a base de cianoacrilato. El animal se dejaba algunos minutos fuera del agua para que el pegamento secase y después era reintroducido al acuario.

Las muestras de hemolinfa obtenidas eran depositadas en tubos ependorf con $200 \mu\text{l}$ de HClO_4 al 2.5%, cada uno, para posteriormente ser llevados a un ultracongelador REVCO de -70°C hasta el momento de su análisis bioquímico.

d. Determinación de GSH

Diez minutos antes de llevar a cabo las determinaciones del contenido de GSH de cada una de las muestras, aquellas se sacaban del ultracongelador para luego centrifugarlas a una temperatura de 4°C y a 3000 rpm durante 10 minutos.

Del sobrenadante se tomaban $50 \mu\text{l}$, los cuales eran añadidos a un tubo de ensaye donde se mezclaban con 1.85 ml de buffer (0.1 M sodio fosfato 0.005 EDTA) pH 8 y $100 \mu\text{l}$ de OPT (o-ftalaldehído, Sigma Chemical Company, St.Louis, MO).

El GSH reacciona, de manera específica, con el OPT en un medio a pH 8, dando origen a un producto altamente fluorescente que puede ser activado a 350 nm con un pico de emisión a 420 nm (Cohn et al, 1966). La mezcla formaba un total de 2ml los cuales eran incubados en la obscuridad por 15 minutos con la finalidad de que el OPT reaccionara con el GSH existente en la muestra. (Hissin et al., 1976)

Una vez transcurrido el tiempo cada una de las muestras era leída en un fluorómetro con longitud de onda de activación de 350nm y 420 nm de emisión. Los valores obtenidos eran interpretados con la ayuda de una curva estándar realizada midiendo la fluorescencia emitida por 200, 150, 100 y $50 \mu\text{g/ml}$ de GSH.

f. Análisis de Resultados

Mortalidad

El método que se utilizó para evaluar la mortalidad de las especies trabajadas consistió en cuantificar a los animales sobrevivientes de cada una de las dos especies estudiadas y para cada fotoperíodo. Para obtener el porcentaje de mortalidad se tomó como el 100% de la sobrevivencia el número de organismos que se tenían al comenzar el experimento. Los organismos restantes al final de las diez semanas para cada uno de los lotes experimentales proporcionaron el dato de sobrevivencia y el porcentaje restante fue tomado como el dato de mortalidad.

Los datos obtenidos se dividieron también por sexo con el objetivo de poder realizar una comparación de la mortalidad entre machos y hembras.

Posteriormente y con los resultados obtenidos se obtuvo el promedio de la mortalidad con los valores de cada una de los tres lotes experimentales, se construyeron las gráficas y para verificar la existencia de diferencias significativas en la mortalidad de las dos especies y los sexos se aplicó la prueba estadística ANOVA de una vía. La significancia fue aceptada con $p < 0.05$.

Niveles basales de GSH

Estos valores fueron obtenidos de las muestras de las primeras dos semanas de los tres lotes experimentales, durante las cuales todos estuvieron bajo las mismas condiciones control, es decir, en fotoperíodo 12:12 y a baja irradiancia ($0.2 \mu\text{M}/\text{s}\cdot\text{m}^2$).

Con estos datos también fue construida una gráfica y se aplicó la prueba estadística de ANOVA de una vía, aceptando la significancia con $p < 0.05$. Lo anterior, con el objetivo de observar si existían diferencias significativas entre las dos especies de acociles estudiadas así como entre los dos sexos.

Efecto del fotoperíodo y la irradiancia en los niveles de GSH en la hemolinfa

Como se menciona anteriormente, el presente experimento tuvo, para cada una de las especies, una duración de diez semanas, por lo cual se obtuvieron 10 datos de cantidad de glutatión en la hemolinfa para cada uno de los organismos de las dos especies estudiadas. Para observar los cambios en cada situación experimental se decidió promediar los resultados por pares de semanas. Así los valores de las semanas 1 y 2, la 3 y 4, la 5 y 6, la 7 y 8 y la 9 y 10 fueron promediados y de esta manera se obtuvieron gráficas y hojas de cálculo con promedios únicamente, lo cual facilitó el análisis de los resultados. Con estos últimos fueron construidas gráficas y para observar si existían diferencias significativas entre las diferentes condiciones y entre los fotoperíodos que fueron utilizados fue aplicada la prueba estadística de ANOVA de una vía, aceptando la significancia con $p < 0.05$. Las pruebas de contrastes se realizaron utilizando la prueba LSD, aceptando la significancia con $p < 0.01$.

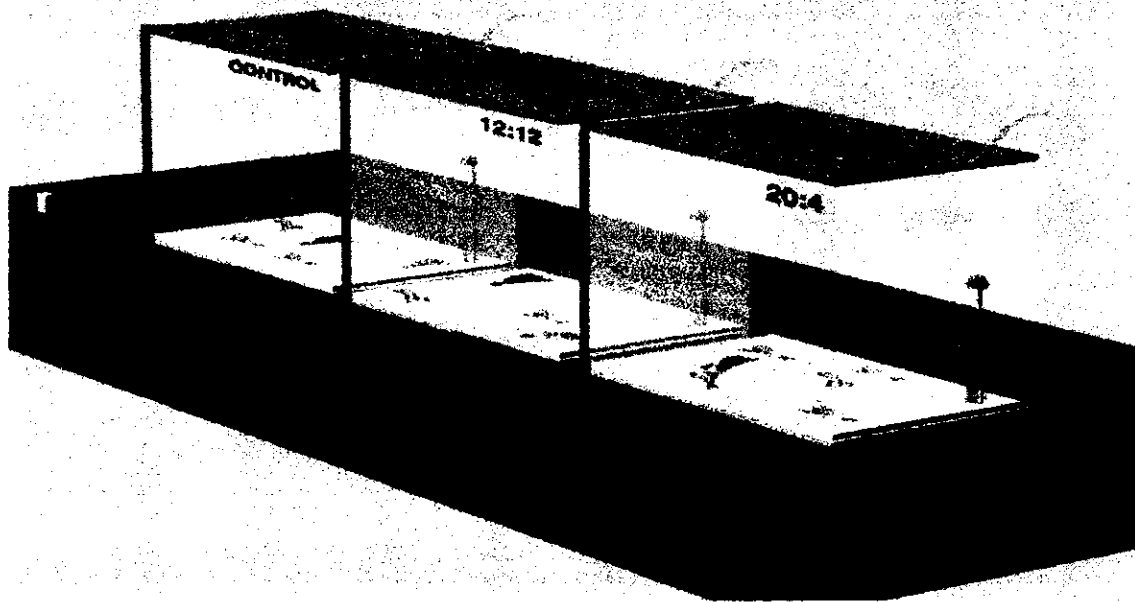
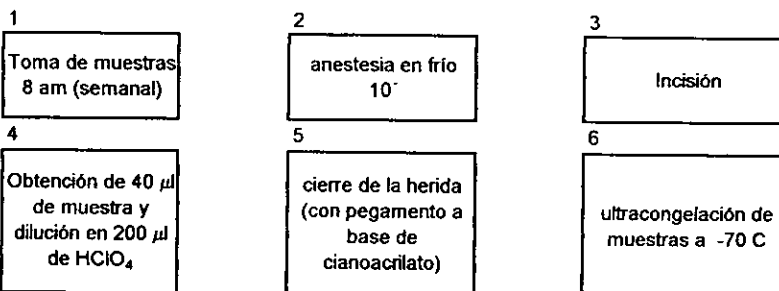


Figura 5. Representación de las condiciones experimentales.

	cont (sem 1 y 2)	exp1 (sem 3 y 4)	rec1 (sem 5 y 6)	exp2 (sem 7 y 8)	rec2 (sem 9 y 10)
Caja 1 Lote 20:04	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	20:04 baja 0.02-0.03 $\text{mM/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	20:04 alta 10-13 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$
Caja 2 Lote 12:12	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 alta 10-13 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$
Caja 3 Lote control	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$	12:12 baja 0.02-0.03 $\mu\text{M/s}\cdot\text{m}^2$

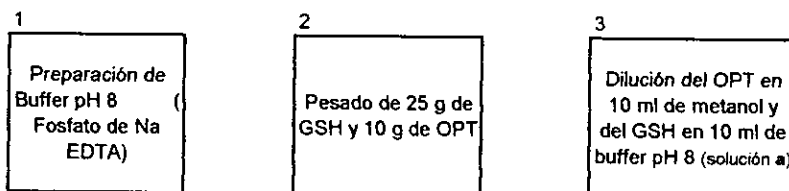
Figura 6. Fotoperiodo e irradiancia a los que fue sometido cada uno de los tres lotes experimentales durante las 10 semanas que duró el experimento.

Toma de muestras

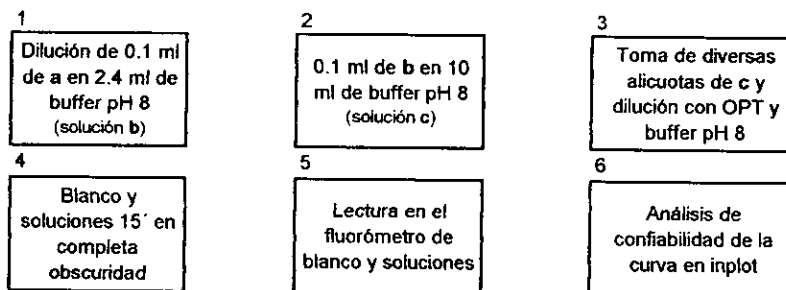


Determinación de GSH

Soluciones



Curva



Lectura de muestras

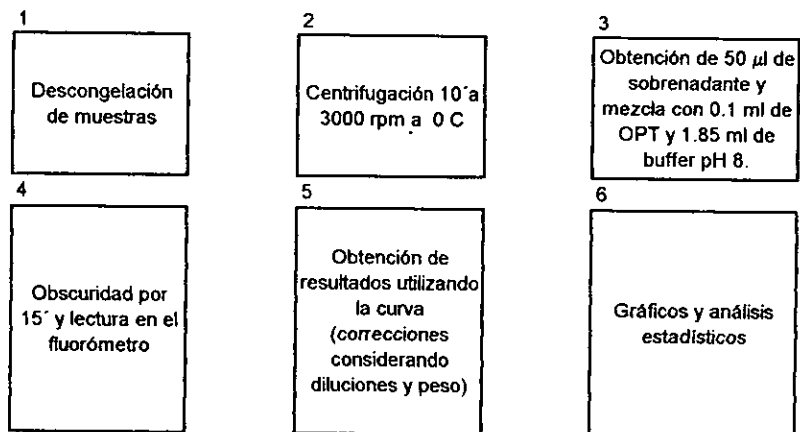


Figura 7. Metodología seguida a lo largo del experimento.

Resultados

y

Discusión

*Lo que necesitamos es imaginación.
y mirar al mundo de una manera distinta*

R.P. Feynman

VII. Resultados y Discusión

a. Mortalidad.

Los resultados de este análisis se muestran en la **figura 9** en la que se observa que en la especie *P. digueti* la mortalidad fue semejante en ambos sexos (40%). Mientras que en *P. clarkii* se puede observar que los machos tuvieron una mortalidad mayor que las hembras de 35 y 10 %, respectivamente.

Tanto el análisis de varianza como la prueba *t* de student realizadas no arrojaron diferencias significativas en la mortalidad entre sexos ni entre especies ($p > 0.05$ y $F = 0.9720$). Sin embargo, en la **figura 8** se puede observar que en *P. digueti* el porcentaje de mortalidad es mayor (45 %) que el de la especie *P. clarkii* (30 %).

A pesar de que nos se encontraron diferencias estadísticas significativas, al observar de nuevo la **figura 9** se podrá notar que el porcentaje de mortalidad en la especie *P. diguetii* es mayor en los machos que en las hembras mientras que en la especie *P. clarkii* la mortalidad presenta porcentajes promedio semejantes.

Los resultados anteriores sugieren una menor capacidad de la especie *P. digueti* para aclimatarse con rapidez a los estímulos ambientales anormales, en este caso la luz, a diferencia de la especie *P. clarkii*, la que al final del experimento tuvo porcentajes de mortalidad menores.

Estos resultados parecen confirmar los hallazgos de experimentos anteriores (Fanjul-Moles et al., 1998) cuyo reporte menciona que después de terminados los experimentos, fue la especie *P. digueti* la que presentó el porcentaje de mortalidad más elevado.

En la **figura 9** se observa también que son los machos de la especie *P. digueti* los que presentan una mortalidad más alta. Esto último y al igual que en el caso de la comparación entre especies nos sugiere una menor capacidad, en el caso de los machos de esta especie, para aclimatarse a estímulos ambientales extremos comparada con la de las hembras.

b. Niveles basales de GSH.

En la **figura 10** se puede observar que los niveles basales de GSH en la especie *P. digueti* (633 ± 33 ng/ml/gr) son más altos que los de la especie *P. clarkii* (311 ± 28 ng/ml/gr).

En cuanto a los valores basales entre sexos se puede observar en la **figura 11** que en *P. digueti* las hembras presentan valores un poco mayores que los machos mientras que en *P. clarkii* son éstos últimos los que presentan niveles más altos. Sin embargo, al realizar las pruebas estadísticas no se encontraron diferencias significativas.

Correlacionando estos resultados con los de mortalidad se puede pensar que los machos de *P. digueti* presentan una mayor mortalidad debido a que sus niveles basales de GSH son menores y por lo tanto su maquinaria anti-oxidativa no cuenta con la eficiencia necesaria para prevenir el daño de las ROS, situación que no ocurre con el sexo femenino de dicha especie y con los machos y las hembras de la especie *P. digueti*.

Al llevar a cabo el ANOVA general, se encontró que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$ y $F = 27.2683$) de los niveles basales de GSH entre las especies y que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$ y $F = 0.07539$) de esta variable entre machos y hembras. El efecto combinado de especies y sexo no arrojó diferencias significativas ($p > 0.05$ y $F = 0.03059$)

Al realizar la prueba de contrastes (LSD), se confirmaron las diferencias significativas entre los niveles basales de ambas especies así como también el hecho de que no existen diferencias significativas entre los sexos dentro de una misma especie. Es decir, que las diferencias entre los machos y las hembras de *P. clarkii* y *P. digueti* no resultaron significativas.

Como se mencionó anteriormente, la especie *P. digueti* se caracteriza por habitar zonas de corrientes moderadas a comparación de *P. clarkii* que se caracteriza por ser una especie excavadora que habita en cuevas y pozas donde la corriente del agua es lenta y depende, en repetidas ocasiones, de la vía anaeróbica para la obtención de energía (Huner, 1988).

El hecho de que a lo largo de su historia evolutiva la especie *P. digueti* haya estado con mucha menor frecuencia sometida a presiones de selección en las cuales los cuerpos acuáticos que solían habitar se encontrarán escasamente oxigenados, ha propiciado que su maquinaria metabólica posea una menor eficiencia para soportar condiciones anaeróbicas que la que posee la especie *P. clarkii* la cual, al haber estado sometida a condiciones anóxicas en repetidas ocasiones a lo largo de su historia evolutiva, desarrolló mecanismos alternos o anaeróbicos para la obtención de energía. (Fanjul-Moles et al., 1998).

Ante una situación lumínica estresante en *P. clarkii* ocurre, al parecer, una depresión metabólica, utilizándose la vía anaeróbica para la obtención de energía. *P. digueti* por el contrario no tiene la capacidad de llevar a cabo aquella depresión metabólica y por consiguiente continúa respirando normalmente o incluso más de lo normal, lo que sin duda produce, en las células y tejidos del organismo, un exceso de ROS y radicales libres. Los niveles basales de GSH en *P. digueti* (mayores con respecto a los de *P. clarkii*) se deben, probablemente, a que los primeros necesitan una maquinaria destoxicante mucho más eficiente que los segundos.

Ciertas especies o poblaciones de acócil que habitan zonas de rápida corriente poseen tasas metabólicas más altas que aquellas que habitan zonas de baja corriente ó en pozas (Burbank et al., 1948), por lo que es posible que los altos niveles basales de GSH encontrados en *P. digueti* - especie que habita cuerpos de agua con corrientes moderadas- a diferencia de *P. clarkii* - especie que habita cuerpos de agua con corriente lenta - reflejen el hecho anterior.

Si la tasa metabólica es mayor en *P. digueti*, el consumo de oxígeno es también mayor y como consecuencia se producen elevadas cantidades de ROS. Por lo tanto, el GSH basal elevado que se observa en esta especie probablemente se debe a que el organismo necesita de esta molécula para contrarrestar el daño que las ROS pudieran provocar en sus células y sus tejidos.

Por otro lado se ha reportado que las especies que viven a bajas latitudes y a mayores temperaturas tienen un consumo de oxígeno mayor que las especies de altas latitudes y de ambientes fríos. Lo anterior resulta de una comparación en el consumo de oxígeno de especies de un mismo género de crustáceo provenientes algunos de una latitud nórdica y de aguas frías y otros de latitudes más bajas y de aguas calientes (Fox, 1936). Incluso se han encontrado diferencias en el consumo de oxígeno entre organismos de la misma especie (*Uca pugnax*) que habitaban en distintas latitudes y en aguas de diferente temperatura (Tashian, 1956). Otros trabajos han demostrado que un gran número de crustáceos tienen un consumo de oxígeno incluso diez veces mayor cuando son especies de aguas cálidas y de bajas latitudes que cuando ocupan hábitats boreales y de aguas frías (Scholander et al., 1953).

Ha sido observado también que a bajas latitudes *P. clarkii* se muestra activo durante los meses fríos en tanto que períodos de inactividad mucho más prolongada han sido observados en los meses calurosos. Este comportamiento se invierte en los organismos de esta especie que habitan regiones de alta latitud, en estos casos los períodos de inactividad ocurren en los meses fríos (Huner, 1988). A diferencia de la especie anterior en *P. digueti* ninguna conducta de hibernación ha sido observada. Los cambios observados en cuanto a la actividad en la primera especie sugieren un cambio de las vías aeróbicas para la obtención de energía, durante los meses de actividad, a la anaeróbica, en los períodos de hibernación. Un cambio que va acompañado por un decremento en la actividad motora.

Las estrategias descritas en el párrafo anterior también han sido observados en otros animales que hibernan (Hochanka et al., 1987). En ellos también las tasas metabólicas decrecen y se presentan niveles de actividad locomotora mucho menores.

En resumen: el hecho de que *P. digueti* viva a una latitud menor y por lo tanto a una temperatura mayor que *P. clarkii* provoca que, a diferencia de la otra especie, su tasa metabólica sea mayor; consuma más oxígeno, produzca más ROS y no sea capaz de utilizar vías anaeróbicas como mecanismo alterno para la obtención de energía, lo cual provoca que esta especie posea niveles basales de GSH mayores que la especie *P. clarkii*.

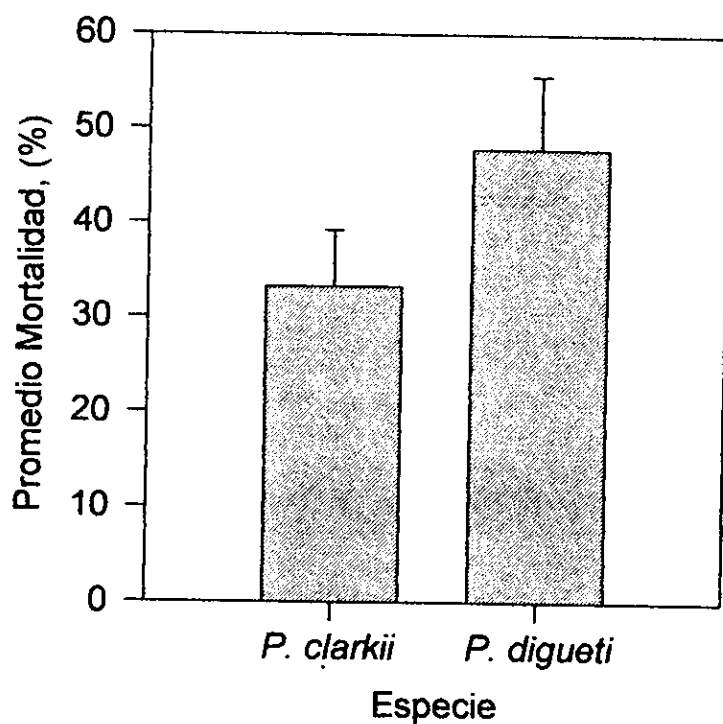


Figura 8. Porcentaje promedio de mortalidad por especie.

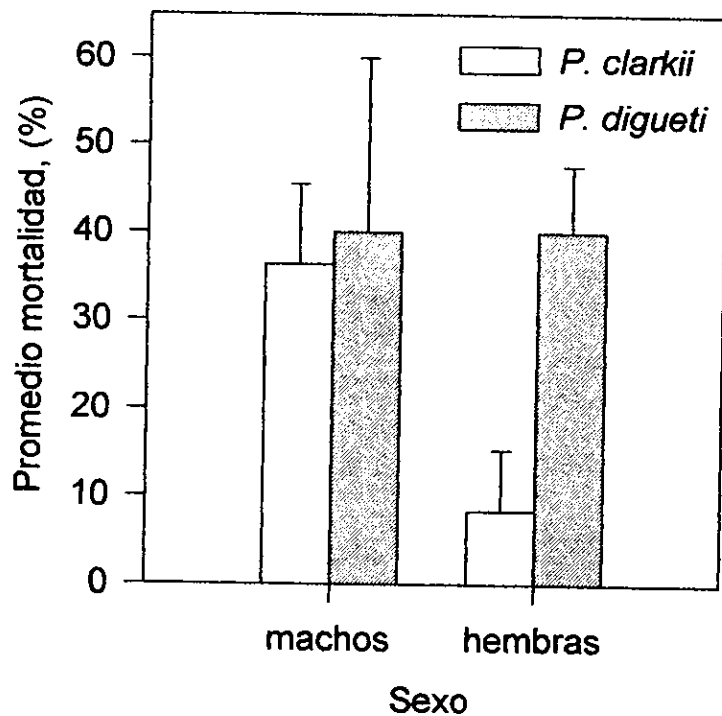


Figura 9. Porcentaje promedio de mortalidad por sexo, en ambas especies de acocil

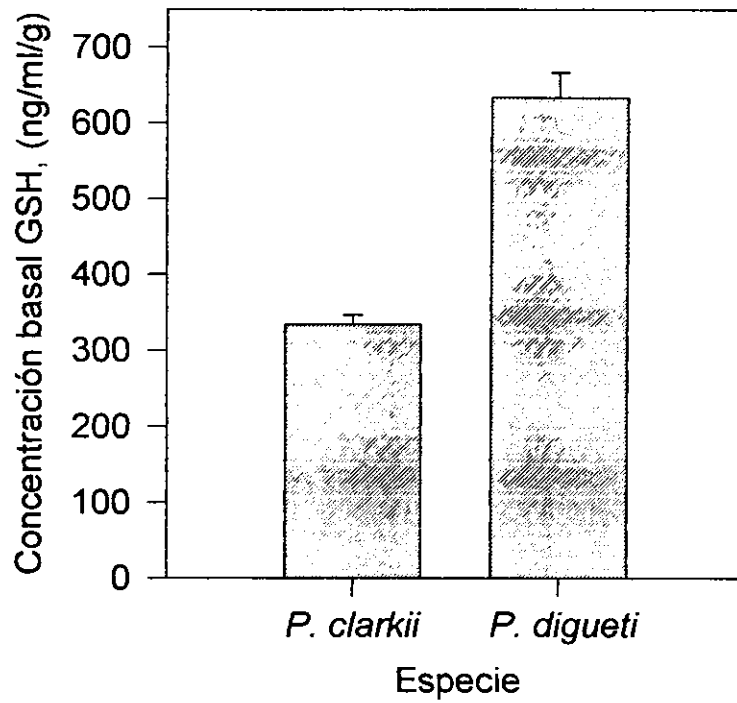


Figura 10. Concentración basal promedio de GSH por especie.

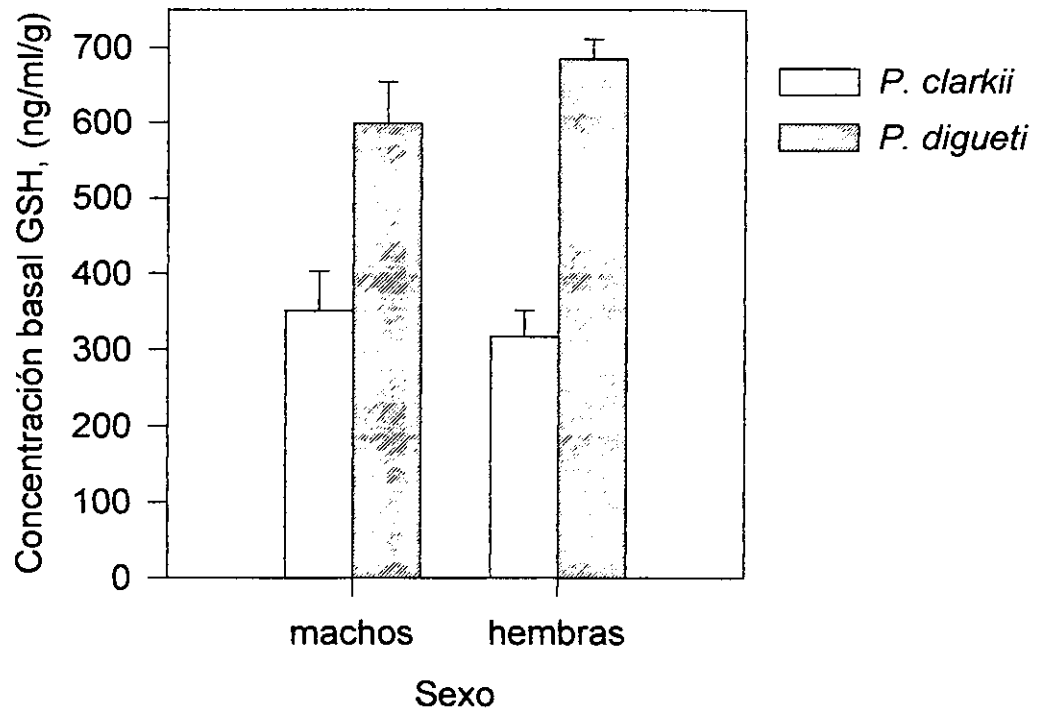


Figura 11. Concentración basal promedio de GSH por sexo, en ambas especies de acocil.

c. Efecto de la irradiancia y fotoperíodo en *P.clarkii* .

Los resultados de esta parte del experimento se muestran en la **figura 12**. El círculo representa el lote sometido al fotoperíodo 20:04, el cuadro al fotoperíodo control y el triángulo al fotoperíodo 12:12. Se observa que el fotoperíodo 12:12 alta irradiancia es el que provoca en los acociles de la especie *P. clarkii* los niveles mas altos de GSH en la hemolinfa.

Al realizar el ANOVA general de una vía a los resultados obtenidos para esta especie, ambos, tanto fotoperíodo ($p < 0.05$ y $F = 12.1896$) como irradiancia ($p < 0.05$ y $F = 9.4865$) mostraron efecto significativo sobre los niveles de GSH en la hemolinfa. Así como también resultó ser significativo el efecto de ambos parámetros combinados ($p < 0.05$ y $F = 2.5231$) sobre la variable anteriormente mencionada. (Tabla 1)

Al realizar la prueba de contrastes (LSD, aceptando la significancia con $p < 0.01$) se encontró que durante las primeras seis semanas o las primeras tres condiciones (control, exp1 y rec1) en las cuales si bien se observan descensos y ascensos en los niveles del tripéptido en la gráfica, no existen diferencias significativas ni entre los tres diferentes fotoperíodos ni entre las condiciones (Tablas 2 y 3), teniendo los valores basales un promedio de 300 ng/ml/g. Lo anterior sugiere que no hay efecto de los tres fotoperíodos a baja intensidad sobre el metabolismo de GSH en esta especie.

En la condición exp2 se puede observar un importante aumento en los niveles de GSH tanto para el fotoperíodo 12:12 como para el 20:04. Por su parte los niveles del fotoperíodo control se mantienen aproximadamente con el mismo promedio que en las condiciones anteriores.

Al realizar la prueba de contrastes (LSD) se encontró que efectivamente existe una diferencia significativa de la condición exp 2 con las condiciones control, exp1, rec1 y rec2 en los organismos sometidos a fotoperíodo 12:12 (Tabla 2, 12:12) y para aquellos sometidos al fotoperíodo 20:04 en la condición exp2 con las condiciones exp1 y rec1 (Tabla 2, 20:04) y que no existe diferencia significativa entre ninguna de las condiciones en el lote control (Tabla 2, control).

La prueba de contrastes (LSD) se analizó también para verificar si existían diferencias significativas entre los tres distintos fotoperíodos (Tabla 3 control, exp1, rec1, exp2 y rec2). Para las tres primeras condiciones y para la última no se encontraron diferencias significativas entre los tres fotoperíodos. Sin embargo, en la condición exp 2 se encontró que existen diferencias significativas entre el fotoperíodo control y el fotoperíodo 12:12 ($p < 0.01$) y entre el fotoperíodo 12:12 y el 20:04 ($p < 0.01$). (Tabla 3 exp2)

Con base en los resultados anteriores, podemos decir que el GSH en la hemolinfa de esta especie alcanza niveles más altos al ocurrir cambios en la irradiancia que cuando se altera el fotoperíodo y que que el variar el primer parámetro provocó un cierto grado de estrés en los organismos, lo cual, y tal como se mencionaba en la hipótesis, muy probablemente esté generando un ambiente reductor como producto de la respiración anaerobia que se inicia en el momento en que se aplica la condición estresante y que perdura hasta que aquella no cese (Fanjul Moles et al., 1998).

Lo anterior demuestra también que la maquinaria metabólica encargada de mantener los niveles de GSH en el organismo es afectada por situaciones de irradiación anormales. Existen trabajos que utilizan contaminantes como situación estresante y en ellos se ha demostrado que la presencia de aquellos en los cuerpos de agua que habita la especie de acocil *P. clarkii*, provocan cambios en la actividad de la enzima glutatión S-transferasa y por lo tanto en la maquinaria metabólica encargada de mantener las cantidades de GSH necesarias para la protección antioxidativa de estos organismos (Nies et al., 1991).

Se observa también en la **figura 12** que es la alta irradiación y no tanto los cambios en el fotoperíodo, lo que al parecer incrementa en mayor proporción, los niveles de GSH en la hemolinfa. Probablemente, estos organismos, por habitar regiones de altas latitudes, están más adaptados a cambios estacionales en la duración de los días y por lo tanto a variaciones en el fotoperíodo. Lo anterior provoca que cambios en este parámetro no les afecte tanto como al parecer sucede con el incremento en la irradiación.

Al analizar la **figura 12** se podrá observar que durante los períodos de recuperación los niveles de GSH no presentan diferencias significativas ni entre los tres diferentes fotoperíodos ni entre las cinco condiciones (Tablas 2 y 3). Estas observaciones sugieren la capacidad por parte de esta especie para adaptarse a las nuevas condiciones y para regresar rápidamente a los niveles basales de GSH en su hemolinfa.

Por otro lado, es interesante el hecho de que los valores promedio de las últimas dos semanas de recuperación (rec2) ($350 + 38$ ng/ml/g) son muy semejantes a los de las semanas iniciales en los tres fotoperíodos trabajados ($400 + 24$ ng/ml/g).

Lo último lleva a pensar en la capacidad de respuesta al estrés de esta especie de acocil ya que, si bien durante el período que duran las condiciones lumínicas extremas estos organismos parecen elevar la actividad de la maquinaria metabólica encargada de regular los niveles de GSH, también son capaces de regresar a su estado normal el funcionamiento de esta última y por lo tanto los niveles de GSH en la hemolinfa. Lo anterior contribuye a que estos organismos puedan sobrevivir incluso en medios donde ocurran, temporalmente, situaciones estresantes.

En los invertebrados después de un período de anoxia, el cual puede ser provocado por una situación estresante, el pH intracelular se reduce por la acumulación de los productos finales del metabolismo anaerobio como lo es el lactato. La recuperación del organismo dependerá mucho de la velocidad con la que dicho pH pueda regresar a su estado preanóxico. Para poder llevar a cabo lo anterior ocurre a nivel del organismo un fenómeno conocido con el nombre de deuda de oxígeno, esto quiere decir que durante la recuperación de un estado de anoxia, se produce un mayor consumo de oxígeno (Ellington, 1983).

En *Oronectes limosus* la presión parcial de oxígeno en el período de recuperación después de la anoxia es bastante más alta que en las situaciones control (Gäde, 1983).

Lo anterior demuestra que la recuperación postanaeróbica es llevada a cabo, principalmente por el metabolismo aeróbico. Si se observa la **figura 12** podrá notarse que en las semanas de recuperación *P. clarkii* posee valores promedio de GSH muy cercanos a los controles, aquello habla de un eficiente mecanismo de recuperación. Al regresar las condiciones normales de luz, estos organismos vuelven a respirar normalmente y el pH, sumamente reductor durante las condiciones lumínicas estresantes, vuelve a la normalidad, evitando así que se sigan produciendo grandes cantidades de GSH.

Si se piensa en la hipótesis del estrés foto-oxidativo, la razón del decremento en los niveles de GSH durante la recuperación es, probablemente, que la molécula es utilizada para prevenir los efectos de las ROS producidas por las condiciones anormales de luz durante las condiciones experimentales.

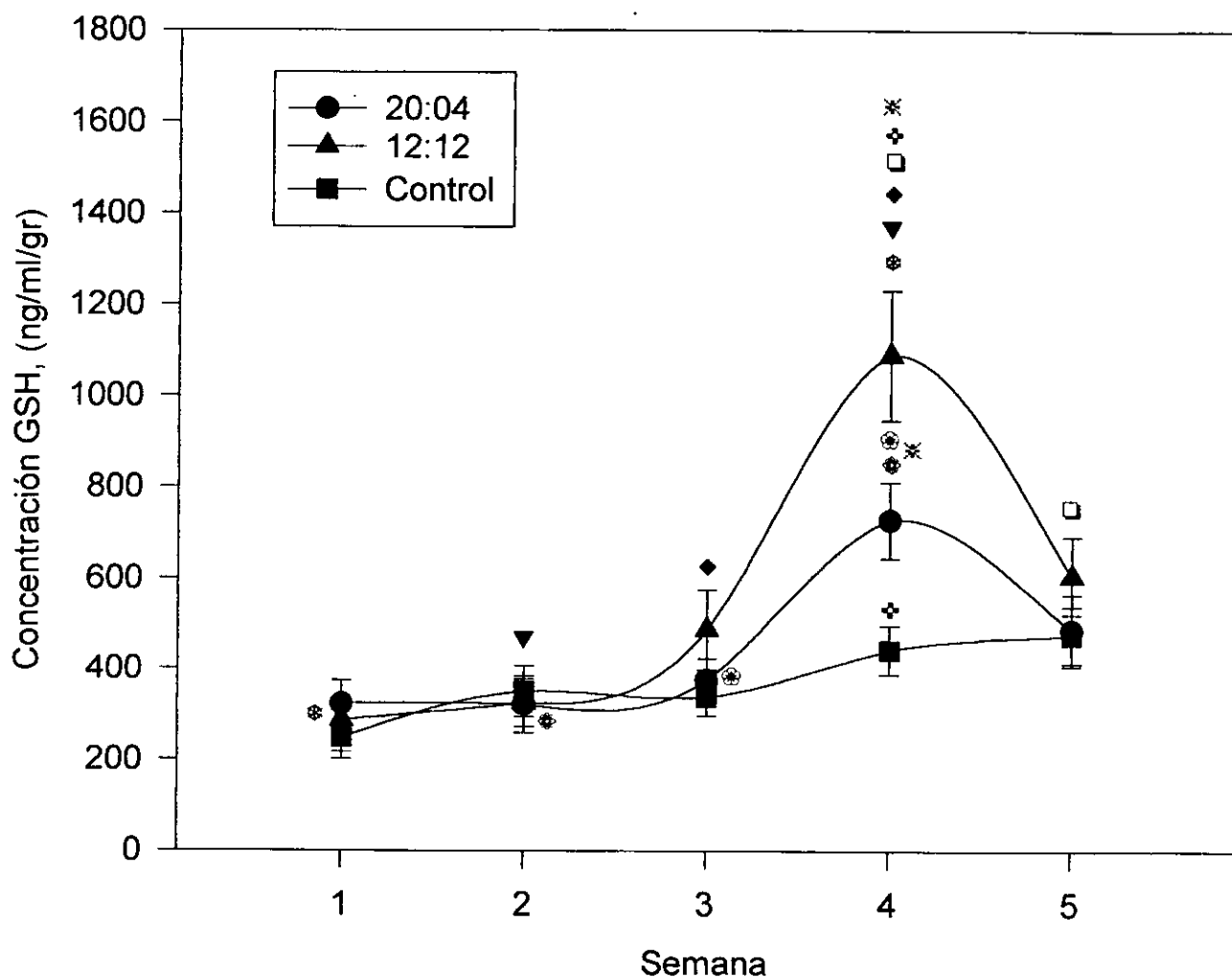


Figura 12. Concentración de GSH de *P. clarkii* en las tres condiciones experimentales, a lo largo de 10 semanas. Los símbolos iguales representan diferencias significativas con $p < 0.01$. (ver texto y tablas 2 y 3 para mayor información).

Tabla 1

Efecto	F	valor de p
Irradiancia	12.18965	0.000001 *
Fotoperíodo	9.48659	0.000163 *
Irradiancia y fotoperíodo	9.52312	0.14977 *

Tabla 2

Fotoperíodo	control				
Condición	cont	exp1	rec1	exp2	rec2
cont					
exp1	0.983665				
rec1	0.983862	0.985665			
exp2	0.261456	0.257002	0.222175		
rec2	0.195152	0.188784	0.155547	0.922409	

Fotoperíodo	12:12				
Condición	cont	exp1	rec1	exp2	rec2
cont					
exp1	0.147731				
rec1	0.797459	0.062964			
exp2	0.000007 *	0.000001 *	0.000003 *		
rec2	0.883397	0.128599	0.645271	0.000001 *	

Fotoperíodo	20:04				
Condición	cont	exp1	rec1	exp2	rec2
cont					
exp1	0.655853				
rec1	0.916618	0.754871			
exp2	0.10729	0.004445 *	0.010126 *		
rec2	0.253189	0.179893	0.247415	0.181054	

Tabla 3

Condición	control		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.212215		
20:04	0.801488	0.269752	

Condición	exp1		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.76905		
20:04	0.842786	0.913888	

Condición	rec1		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.072997		
20:04	0.667387	0.126186	

Condición	exp2		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.000001 *		
20:04	0.178257	0.000015 *	

Condición	rec2		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.272164		
20:04	0.949015	0.369242	

Tabla 1. Valores de p y de F obtenidos al realizar el ANOVA General realizado para los datos de *P. clarkii*. Significancia aceptada con $p < 0.05$.

Tabla 2. Valores de p obtenidos de la prueba de contrastes (LSD) realizada entre condiciones para cada fotoperíodo en *P. clarkii*. Significancia aceptada con $p < 0.01$.

Tabla 3. Valores de p obtenidos de la prueba de contrastes (LSD) realizada entre los tres distintos fotoperíodos para cada condición en *P. clarkii*. Significancia aceptada con $p < 0.01$.

d. Efecto de la irradiancia y fotoperiodo en *P. digueti*

Los resultados de esta parte del experimento se muestran en la **figura 13**. En ella el círculo representa los valores promedio obtenidos de los organismos sometidos al fotoperiodo 20:04; el cuadro los de aquellos sometidos al fotoperiodo 12:12 y el triángulo el de los que fueron sometidos al fotoperiodo control.

Al realizar el ANOVA general de una vía (aceptando la significancia con $p < 0.05$) para los resultados obtenidos de esta especie, se obtuvo que ambos tanto la irradiancia ($p < 0.05$ y $F=7.6368$) como el fotoperiodo ($p < 0.05$ y $F= 14.35661$) mostraron efecto significativo sobre los niveles de GSH en la hemolinfa de los organismos. El efecto de ambos parámetros combinados también resultó ser significativo ($p < 0.05$ y $F= 2.50554$). (Tabla 4)

Al observar la gráfica y analizando las diferencias entre los tres fotoperíodos se tiene que para la condición control del fotoperíodo 20:04 (primera y segunda semanas), los valores son muy parecidos a los presentados por los organismos sometidos a los otros dos fotoperíodos presentando una media de $620 + 58$ ng/ml/g. En la condición siguiente ó experimental 1 (tercera y cuarta semana) se observa un incremento importante del nivel de GSH en el fotoperíodo 20:04. En la condición de recuperación 1 (quinta y sexta semanas) los niveles de GSH se hacen aún mayores también en el caso del fotoperíodo 20:04 mientras que los otros dos continúan con promedios similares a los iniciales. En la condición exp2 (séptima y octava semanas) el nivel de GSH en el fotoperíodo 20:04 mantuvo el mismo valor que en la condición anterior, para el 12:12 el nivel de GSH se incrementó de manera importante mientras que el fotoperíodo control se mantuvo con un promedio semejante al de las condiciones anteriores. Finalmente, en la condición de recuperación 2 (novena y décima semanas) si bien los niveles de GSH decrecen un poco en la condición 20:04, no logran alcanzar los valores de la primera condición o control. Los niveles del fotoperíodo 12:12 también se observan elevados y los del fotoperíodo control normales.

Al analizar los resultados de la prueba de contrastes (LSD) se encontró que en la condición control no existen diferencias significativas entre los tres fotoperíodos. Por su parte en la condición exp1 se encontraron diferencias significativas entre el fotoperíodo control y el 20:04 y entre éste último y el 12:12. (Tabla 6, exp1). En la condición rec1 se encontró diferencia significativa entre los fotoperíodos 12:12 y el 20:04 (Tabla 6, rec1). Para la condición exp2 se encontraron diferencias significativas entre el fotoperíodo 12:12 y el control y entre éste último y el fotoperíodo 20:04 (Tabla 6, exp2) y para la condición rec2 se encontró diferencia significativa entre el fotoperíodo control y el 20:04 (Tabla 6, rec2).

En cuanto al efecto de las condiciones o irradiancia la prueba de contrastes LSD nos muestra a través de sus valores de p que en el caso del lote control no existen diferencias significativas entre las cinco condiciones (Tabla 5, control), que para el lote sometido a fotoperíodo 12:12 hay diferencias significativas de la condición exp2 con la control, la exp1 y la rec1, que en realidad son todas de baja irradiancia y de fotoperíodo 12:12 (Tabla 5, 12:12) y que para el caso del lote 20:04 existen diferencias significativas de la condición control con la exp1, rec1, exp2 y rec2 así como entre la condición rec1 y exp2 (Tabla 5, 20:04).

La gráfica y el resultado de los análisis arrojaron el hecho de que es el fotoperíodo 20:04 el que produce niveles promedio de GSH más altos y que éstos se incrementan aún en condiciones de baja irradiancia. Lo anterior demuestra que las alteraciones en el fotoperíodo, así como la alta irradiancia afectan a esta especie. El hecho de que el fotoperíodo 20:04 está afectando los niveles promedio de GSH se confirma cuando se observa que el fotoperíodo 12:12 o control, a baja irradiancia no produce elevación significativa de este tripéptido y que este mismo fotoperíodo si hace variar significativamente los niveles de GSH cuando su irradiancia es alta (Tabla 5). Por lo tanto, fotoperíodo e irradiancia afectan los niveles promedio de GSH en la hemolinfa de los organismos de esta especie.

En el caso de esta especie de acocil y a diferencia de *P. clarkii*, es evidente que tanto las alteraciones en la longitud del fotoperíodo como los cambios en la irradiancia afectan de manera importante los niveles de GSH en la hemolinfa.

La primera condición experimental (baja intensidad) produce una elevación en los valores de ambos fotoperíodos siendo mucho más grande aquella del fotoperíodo 20:04.

Lo anterior lleva a pensar, que la alteración en el fotoperíodo es también causante de estrés en estos organismos. Esto último se corrobora cuando al pasar a las primeras semanas de recuperación no se observa decremento en los niveles de GSH en el caso del fotoperíodo 20:04. El hecho anterior, es una diferencia importante con los organismos de la especie *P. clarkii*, quienes si poseen la capacidad de recuperarse después de haber sido sometidos al estrés lumínico.

Sin embargo, en la condición exp 2 donde puede observar con claridad que la alteración de ambos parámetros provoca un aumento importante en los niveles de GSH en los organismos. Esto es porque al incrementar las irradiancias de ambos fotoperíodos se observan niveles considerablemente más altos de GSH.

Finalmente, con el segundo período de recuperación se vuelve a constatar la escasa capacidad de recuperación de estos organismos ante los cambios de los parámetros lumínicos: irradiancia y fotoperíodo, ya que los valores observados son bastante mas grandes que los presentados en un principio por estos organismos durante la condición control.

Los resultados sugieren que la especie *P. digueti* es mucho menos tolerante que la especie *P. clarkii* a los cambios de los parámetros trabajados, es decir, que no es capaz de regresar sus niveles de GSH a los valores control o basales después de haber sido sometida a condiciones lumínicas alteradas.

Los niveles elevados de GSH en la hemolinfa de esta especie durante los períodos de recuperación parecen indicar la escasa habilidad que posee ésta para mantener en niveles normales la producción y la liberación del tripéptido de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo a la hemolinfa y viceversa cuando son sometidos a estrés lumínico. Aunado a lo anterior, *P. digueti*, en situaciones lumínicas estresantes, al parecer, es incapaz de regular eficientemente los mecanismos metabólicos de obtención de energía. El resultado es la aparición de una serie de problemas que desembocan en la muerte de estos organismos.

Lo anterior puede corroborarse si se observa el incremento de GSH que ocurre durante la condición de recuperación en los organismos sometidos al fotoperíodo 20:04. Esto último parece indicar la incapacidad de estos organismos para controlar los niveles de GSH en la hemolinfa después de ser sometidos a estrés lumínico ó bien a una producción anormal de GSH como resultado del efecto reductor provocado por el incremento en la producción de lactato en estos organismos. Se ha demostrado y como ya se mencionaba en los antecedentes de este trabajo (Fanjul-Moles et al., 1998) que en ambas especies de acocil, cuando son sometidas a condiciones lumínicas de alta irradiancia, se presenta un período de anaerobiosis y por lo tanto una concentración alta de lactato en la hemolinfa. Las concentraciones de esta última molécula durante aquel experimento fueron mucho mayores en la especie *P. digueti* que en *P. clarkii*. Lo anterior quizá esté provocando una mayor acidosis en el plasma de la primera especie que provoca, en primera instancia, niveles mayores de GSH en la hemolinfa y en segunda, la muerte de los organismos al no poder sobrevivir en aquel ambiente excesivamente ácido.

También se ha reportado que la producción de GSH juega un papel importante en la regulación de la actividad intracelular de la LDH (lactato deshidrogenasa) (Wimberger et al., 1997). Funcionando así, el GSH como un regulador de las dos vías que los organismos poseen para obtener energía del material que ingieren: la glicolítica y la oxidativa.

Lo dicho párrafos arriba sienta las bases para entender un poco mejor por qué *P. digueti* es una especie con un hábitat tan restringido. Ello se debe, en parte, a que requiere de condiciones óptimas y precisas para poder vivir, es decir, que cualquier cambio en el ambiente es capaz de producirle daños irreversibles en su maquinaria metabólica y especialmente en la encargada de disminuir los efectos dañinos que produce el exceso de radicales libres y ROS en las células, órganos y tejidos del organismo.

En este trabajo se demuestra lo anterior cuando se observa que la mortalidad en esta especie (45%) es mayor que la de *P. clarkii* (30%) mostrando así su incapacidad para adaptarse a cambios en las condiciones lumínicas trabajadas: fotoperíodo e irradiancia.

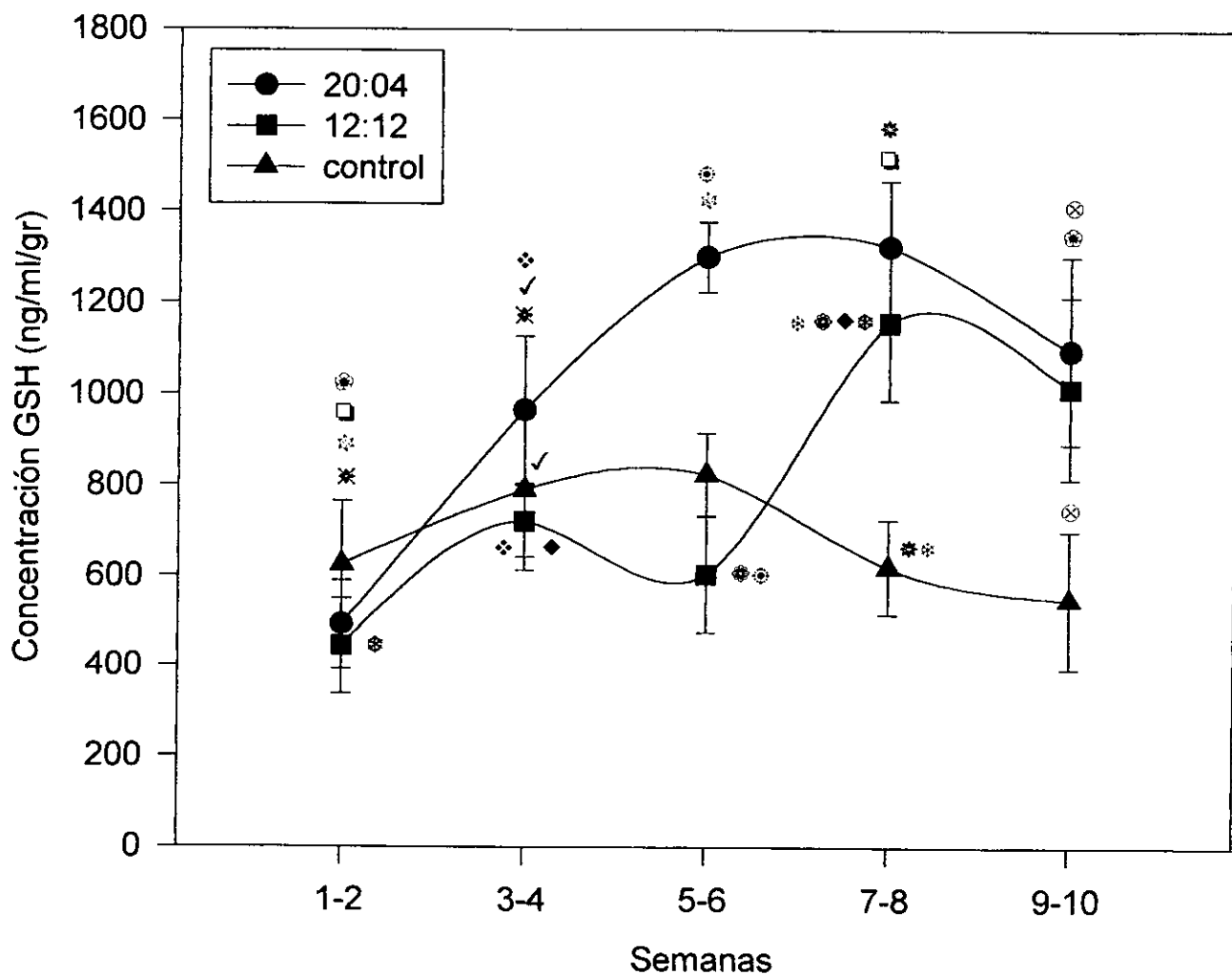


Figura 13. Concentración de GSH de *P. digueti* en las tres condiciones experimentales, a lo largo de 10 semanas. Los símbolos iguales representan diferencias significativas con $p < 0.01$. (ver texto y tablas 5 y 6 para mayor información).

Tabla 4

Efecto	F	valor de p
Irradiancia	7.63688 *	0.000025 *
Fotoperíodo	14.35661 *	0.000004 *
Irradiancia y fotoperíodo	2.50554 *	0.16722 *

Tabla 5

Fotoperíodo	control				
Condición	cont	exp1	rec1	exp2	rec2
cont					
exp1	0.763566				
rec1	0.070335	0.171223			
exp2	0.64612	0.909913	0.172123		
rec2	0.627515	0.474446	0.033589	0.369912	

Fotoperíodo	12:12				
Condición	cont	exp1	rec1	exp2	rec2
cont					
exp1	0.863701				
rec1	0.433044	0.580462			
exp2	0.000168 *	0.001506 *	0.009236 *		
rec2	0.516541	0.459475	0.587664	0.030405	

Fotoperíodo	20:04				
Condición	cont	exp1	rec1	exp2	rec2
cont					
exp1	0.003108 *				
rec1	0.000561 *	0.243423			
exp2	0.000561 *	0.028304	0.509879		
rec2	0.000561 *	0.571001	0.71959	0.345659	

Tabla 6

Condición	control		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.859476		
20:04	0.638245	0.776597	

Condición	exp1		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.981239		
20:04	0.010218 *	0.010113 *	

Condición	rec1		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.425103		
20:04	0.074442	0.010758 *	

Condición	exp2		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.000711 *		
20:04	0.00015 *	0.306586	

Condición	rec2		
Fotoperíodo	control	12:12	20:04
control			
12:12	0.053481		
20:04	0.002676 *	0.138858	

Tabla 4. Valores de p y de F obtenidos al realizar el ANOVA General realizado para los datos de *P. digueti*. Significancia aceptada con $p < 0.05$.

Tabla 5. Valores de p obtenidos de la prueba de contrastes (LSD) realizada entre condiciones para cada fotoperíodo en *P. digueti*. Significancia aceptada con $p < 0.01$.

Tabla 6. Valores de p obtenidos de la prueba de contrastes (LSD) realizada entre los tres distintos fotoperíodos para cada condición en *P. digueti*. Significancia aceptada con $p < 0.01$.

e. Discusión General

Diferencias en la respuesta al estrés lumínico en las especies estudiadas.

En el presente trabajo fue posible observar que los niveles de GSH en la hemolinfa de la especie *P. clarkii* fueron afectados por la irradiancia pero no por el fotoperíodo, mientras que en la especie *P. digueti* los dos parámetros lumínicos con los que se trabajó mostraron efectos significativos sobre la variable, sin embargo, el fotoperíodo fue el parámetro que en mayor grado alteró los niveles de GSH en esta especie.

Las observaciones anteriores sugieren que *P. digueti* al ser una especie que habita en regiones de baja latitud no se adapta fácilmente a fotoperíodos largos. La irradiancia, al parecer, tuvo un efecto parecido en ambas especies debido a que las dos poseen hábitos nocturnos y son excavadoras, por lo que en pocas ocasiones se exponen a luz de alta irradiancia.

P. digueti a diferencia de *P. clarkii* no es capaz de tolerar la anaerobiosis y/o la depresión metabólica que produce la luz con alta irradiancia y largos fotoperíodos y es por ello que presenta un porcentaje de mortalidad más elevado.

Efecto de la luz sobre la cadena respiratoria

En investigaciones recientes se reportaron los efectos de la luz sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se encontró que la luz blanca de alta intensidad inhibe el consumo de oxígeno. Lo anterior parece indicar que la luz inhibe algún proceso en el ciclo de Krebs. Se reporta también que la luz visible de alta intensidad inhibe la síntesis de proteínas, el crecimiento y la división celular de la levadura. Debido a lo anterior se atribuye la inhibición de la respiración a la inhibición de la síntesis de proteínas pero se incluye la posibilidad de que la luz esté afectando directamente a alguna enzima o cofactor de la respiración (Ninneman, 1970). Los hechos anteriores quizá puedan explicar el por qué, en las especies de acocil estudiadas, al ser expuestas a condiciones de luz extremas, se inhibía la respiración aeróbica y se utilizaba, como vía alterna de obtención de energía, la anaerobiosis (Fanjul-Moles et al., en 1998).

Con respecto a lo anterior y recordando la hipótesis principal de este trabajo en la cual se mencionaba que las características extremas de la luz producen estrés y por lo tanto un decremento en las funciones metabólicas y la anaerobiosis, habría que mencionar que durante esta última el oxígeno, si bien no es utilizado para la obtención de energía, continua entrando al organismo ya que la presión parcial del mismo debe estar en equilibrio con el ambiente. Por lo tanto, el gas que no es utilizado, probablemente, produzca la generación de una mayor cantidad de radicales libres. Esto último llevaría al organismo a incrementar también sus niveles de GSH para contrarrestar el daño que aquellas ROS pudieran provocar.

Diferencias individuales en los niveles de GSH

Diferencias tanto intraespecíficas como entre los organismos de una misma especie en los niveles de GSH en la hemolinfa también pudieron ser observadas en el presente trabajo. Estos hechos concuerdan con los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Monier, 1936). Las diferencias observadas, probablemente, se deban a que la maquinaria metabólica encargada de mantener los niveles adecuados de GSH de cada individuo responde de manera distinta al estrés, en el caso del presente trabajo, provocado por las características lumínicas extremas y a que cada organismo produce, transporta y elimina de diferente manera las ROS que se producen en el organismo.

Eficiencia en la utilización del metabolismo anaerobio

Ha sido observado que cuando se coloca un cangrejo en un recipiente con agua de mar y éste se sella herméticamente, el animal consume el oxígeno y muy poco tiempo después se halla en estado de asfixia. Al medir el nivel de GSH después de la condición anterior se observa un incremento en los niveles de aquel tripéptido que va de los 208 a los 261mg (Monier, 1936).

Recientemente fue sugerido que la especie de acocil *P. clarkii* puede incrementar la concentración de lactato acelerando la glicólisis anaeróbica obteniendo por medio de ese mecanismo la energía generada a través de las vías aeróbicas. Esto último puede realizarlo hasta que se restablezcan las concentraciones normales de oxígeno. *P. digueti* por el contrario no es capaz de utilizar eficientemente el metabolismo anaerobio por lo que depende en mucho mayor grado del aeróbico. (Jallier et al., 1992; Fanjul-Moles et al., 1998).

Lo anterior sugiere que los altos niveles de GSH que se presentan en la especie *P. clarkii* durante el fotoperiodo extremo a alta irradiancia se debe a que estos organismos, al encontrarse ante una situación estresante, disminuyen su consumo de oxígeno y obtienen su energía utilizando el metabolismo anaerobio y por lo tanto producen mayores cantidades de lactato. Lo anterior provoca una elevada acidosis en las células del organismo, es decir, que se generan grandes cantidades de iones hidrógeno que pueden ser utilizados para reducir el GSSG existente y transformarlo a GSH o en su defecto para producir mas GSH. La ventaja de esta especie es que puede, fácilmente, volver a utilizar el metabolismo aerobio cuando finaliza la situación estresante y vuelve a respirar con normalidad.

La especie *P. digueti* al ser sometida a situaciones estresantes también disminuye su consumo de oxígeno, hace uso de su metabolismo aneróbico y produce lactato el cual produce acidosis y por lo tanto una elevada cantidad de iones hidrógeno. A diferencia de la otra especie, ésta, al finalizar las condiciones estresantes es incapaz de volver al metabolismo aeróbico por lo que continúa produciendo lactato y la acidosis que se genera, provoca, por un lado, el incremento de los niveles de GSH y, por el otro, un cambio en el pH interno que los organismos no pueden soportar y que al poco tiempo les ocasiona la muerte. De hecho durante el experimento fue observado que en los

organismos de ambas especies que morían, por lo general presentaban niveles de GSH considerablemente altos.

Las observaciones y resultados anteriores apoyan el hecho de que la especie *P. digueti* al habitar cuerpos de agua bien oxigenados pocas veces tiene la necesidad de recurrir a su metabolismo anaeróbico; por lo que el cambio de una a otra vía se realiza con menos eficiencia que en la especie *P. clarkii* que por habitar zonas de baja oxigenación constantemente debe utilizar las vías anaeróbicas para la obtención de energía.

Sistema neuroendócrino y actividad locomotora.

Experimentos recientes (Fanjul-Moles et al., 1998) reportan que durante la primera semana en la que los organismos se encontraban en fotoperíodo 12:12 a alta irradiancia el porcentaje de actividad locomotora se incrementó y el consumo de oxígeno disminuyó. En otras especies de crustáceos ha sido observada hiperactividad como una respuesta transitoria a la hipoxia (Hervant et al., 1995). Sin embargo en la segunda semana del fotoperíodo 20:04 ambas especies redujeron su actividad locomotora indicando con ello un gasto de energía menor producida por la situación lumínica estresante. En ambas especies el fotoperíodo extremo parece inhibir la actividad locomotora.

La actividad locomotora así como la maquinaria metabólica está regulada por diversos procesos neuroendócrinos.

En acociles del género *Cambarus* se observó un incremento en la actividad locomotora cuando se les fue extirpado el pedúnculo ocular y aquella se restablecía cuando se administraba a los organismos un factor neurohumoral producido por el mismo pedúnculo (Scudamore et al., 1947). De la misma manera, el control del pedúnculo ocular sobre la tasa metabólica del acocil ha sido demostrada en los acociles (Fingerman, 1955).

Los hechos anteriores sugieren que en el presente trabajo el efecto de las características extremas de la luz actúan de manera importante sobre las estructuras neurales y endócrinas responsables del control del comportamiento y de las funciones metabólicas como lo es, en este caso, el mantenimiento de los niveles de GSH.

GSH en órganos y tejidos

Otra de las razones por las cuales, probablemente, se observan altos niveles de GSH en la hemolinfa, al variar las condiciones lumínicas, podría deberse al incremento en el transporte de este tripéptido de los órganos productores (los músculos, el hígado -en este caso hepatopáncreas-, la retina y las células sanguíneas (Almar et al., 1987) a otros órganos y tejidos. Lo anterior con el objetivo de aumentar el poder antioxidativo en las partes del organismo que más lo requieran y que de alguna manera se vean más afectadas por las condiciones lumínicas estresantes.

Efecto del GSH sobre la LDH

Reportes recientes indican que el GSH inhibe la lactato deshidrogenasa (LDH) de los músculos tanto de rata como de conejo evitando con ello la liberación, tanto *in vivo* como *in vitro* del lactato que se produce en ellos.

Lo anterior apoya los resultados del presente y otros trabajos (Fanjul-Moles et al., 1998). Cuando las dos especies de acocil estudiadas son expuestas a situaciones lumínicas estresantes la concentración de lactato en la hemolinfa se incrementa pero en *P. digueti* el tripéptido alcanza niveles mayores que *P. clarkii*. Lo anterior produce una elevada acidosis en la hemolinfa de la primera especie que aquella no puede soportar. Los niveles mas elevados de GSH en *P. digueti* provocan que el lactato producido por la anaerobiosis, no pueda ser liberado ya que la LDH se encuentra inhibida y las altas concentraciones de iones hidrógeno acaban por matar al organismo.

Una manera alterna de explicar lo anterior, sería apoyando la hipótesis de que las características anormales de la luz provocan un aumento en la cantidad de ROS producidas por los organismos y que como consecuencia de esto ocurre una elevación en los niveles de GSH. Este último aumento podría inhibir a la LDH, provocando que el lactato producido por la utilización de las vías anaeróbicas durante las condiciones lumínicas estresantes (Fanjul-Moles et al 1998) no pueda ser liberada y que por lo tanto se mantenga el estado reductor del medio, lo cual haría que los niveles de GSH se incrementaran como producto de la gran cantidad de iones hidrógeno disponible.

Efecto de la deuda de oxígeno

En la hipótesis del presente trabajo se proponía que los niveles de glutatión reducido (GSH) quizá se incrementaban como producto de que, durante las condiciones estresantes y al ocurrir la respiración anaeróbica, se generaba una deuda de oxígeno que era saldada una vez que se volvían a utilizar las vías aeróbicas. Esto último provocaba la existencia de un exceso de oxígeno el cual al no ser utilizado para la obtención de energía a partir de los carbohidratos, era transformado, debido a la ganancia de electrones, en radicales libres o ROS (Ellington, 1983).

Lo anterior parece bastante razonable y sin embargo en caso de suceder, el incremento en los niveles de GSH debería observarse en los períodos de recuperación, en donde el organismo ya no está sujeto a las condiciones lumínicas estresantes y por lo tanto su respiración vuelve a ser aeróbica. Esta última situación no se observa en los resultados del presente trabajo ya que los niveles elevados de GSH se presentan durante las semanas en las cuales se aplican las condiciones experimentales extremas. Por ello se propone que lo sugerido en párrafos arriba, relacionado con la respiración anaeróbica y la excesiva producción de lactato por estos organismos como respuesta a la situación estresante a la cual se hallan sometidos (Fanjul-Moles et al 1998), es lo que realmente está provocando los cambios en los niveles de GSH en la hemolinfa de las dos especies de acocil estudiadas.

Conclusiones

Vinimos a soñar

*Así lo dejó dicho Tochiutzin,
Así lo dejó dicho Coyolchiuhqui:*

*De pronto salimos del sueño,
sólo vinimos a soñar,
no es cierto, no es cierto,
que vinimos a vivir sobre la Tierra.*

*Como yerba en primavera
es nuestro ser.*

*Nuestro corazón hace nacer, germinan
flores de nuestra carne.*

*Algunas abren sus corolas,
luego se secan.*

Así lo dejó dicho Tochiutzin.

Tochiutzin. Poeta de la lengua Nahuatl (siglo XV)

IX. Conclusiones

- La especie *P. digueti* presentó, en el presente trabajo, un porcentaje de mortalidad mayor que la especie *P. clarkii*. Esto último sugiere la escasa resistencia de la primera especie ante las condiciones lumínicas estresantes analizadas. A diferencia de *P. clarkii*, esta especie, si bien incrementa sus niveles de GSH, no logra alcanzar de nuevo los niveles control, lo cual le provoca la muerte.
- El nivel basal de GSH en las especies estudiadas depende de los nichos ecológicos que ellas suelen ocupar. La especie *P. clarkii* al habitar cuerpos de agua poco oxigenados posee un nivel basal de GSH menor que la especie *P. digueti* que habita cuerpos de agua con buena oxigenación y que pocas veces tiene que hacer uso de su metabolismo anaerobio.
- Los niveles de GSH en la hemolinfa de la especie *P. clarkii* son afectados por la irradiancia pero no por el fotoperíodo.
- Los niveles de GSH en la hemolinfa de la especie *P. digueti* son afectados por los dos parámetros lumínicos con los que se trabajó. Sin embargo, el fotoperíodo tuvo un efecto mas significativo que la irradiancia.
- Las características extremas de la luz producen, sin duda, un efecto en las estructuras neurales y endócrinas responsables del control tanto del comportamiento como de las funciones metabólicas entre ellas de los niveles de GSH en la sangre o hemolinfa.
- Los niveles de GSH y la relación entre la concentración de lactato y el consumo de oxígeno (Fanjul-Moles et al 1998) sugieren diferencias en las dinámicas fisiológicas de estas dos especies ante el estrés lumínico.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

X. Perspectivas

-

El glutatión reducido o GSH representa tan sólo una de las dos formas que el tripéptido glutatión puede adoptar. La otra es el glutatión oxidado o GSSG.

Observar y analizar la variación en los niveles de esta última forma del glutatión en la hemolinfa de los acociles al ser sometidos a estrés lumínico, proporcionaría datos útiles para entender, de una mejor manera, el funcionamiento de la maquinaria metabólica encargada de mantener en equilibrio los niveles de GSH y de GSSG, la cual a su vez contribuye a incrementar la eficiencia de los mecanismos antioxidativos de las especies estudiadas, en particular y la de los demás organismos, en general.

-

Los resultados del presente trabajo sugieren que los niveles de GSH en la hemolinfa de los acociles se incrementan durante el estrés lumínico. Esto último se agrega al hecho de que durante éste tipo de estrés se producen elevadas cantidades de lactato, como producto de la respiración anaeróbica (Fanjul-Moles et al., 1998)

Con el objetivo de verificar lo anterior se podrían llevar a cabo dos experimentos más, siguiendo siempre las condiciones lumínicas que fueron utilizadas en el presente trabajo:

Por un lado, se podrían medir los niveles de lactato y el pH en la hemolinfa de los acociles. Lo anterior con el objetivo de verificar si efectivamente se produce la respiración anaeróbica durante los periodos de estrés y si aquella contribuye a disminuir el pH de la hemolinfa.

Por otro lado, se propone que podría medirse la actividad de la glutatión reductasa, enzima encargada de llevar a su estado reducido al glutatión. Para realizar esto último debería ser utilizado el hepatopáncreas de los acociles ya que es en este órgano donde se ha reportado que la enzima presenta su mayor actividad.

-

Los altos niveles de GSH que fueron encontrados en la hemolinfa se deben, al parecer, a que durante el estrés el tripéptido debe ser transportado de su lugar de síntesis hasta otros órganos y tejidos que lo requieran para evitar el daño que las ROS pudieran provocar.

Con el objetivo de verificar si lo anterior ocurre, podrían medirse los niveles de GSH y de GSSG en otros órganos y tejidos como por ejemplo, en hepatopáncreas, cerebro y retina.

- Dado que la luz penetra y afecta al organismo vía sistema nervioso, éste último, probablemente sufre el estrés foto-oxidativo en mucho mayor grado que los demás órganos y tejidos. Las ROS ahí producidas deben ser rápidamente eliminadas por lo que los niveles de GSH y GSSG deberán responder a tal situación. Por lo tanto, el determinar los niveles de estas dos moléculas en ciertas regiones relacionadas con el sistema nervioso central, como lo son el cerebro y la retina, será de fundamental importancia para entender de qué manera responde el sistema nervioso al estrés provocado por la luz en estos organismos.

- Al igual que muchas otras funciones y moléculas sugerimos que tanto el GSH como el GSSG deben poseer un ritmo circadiano. Lo anterior resultaría en una sensibilidad diferencial de los organismos a ciertas situaciones estresantes que se presentan durante el día.

En el caso en que la luz es utilizada como agente estresante y debido a que los acociles tienen hábitos nocturnos se espera que a lo largo del día los niveles de GSH y GSSG así como la maquinaria enzimática encargada de mantener en equilibrio sus niveles posean un cierto ritmo. Por lo cual otro de los experimentos a realizar sería aquel destinado a verificar si efectivamente existe un ritmo circadiano en el metabolismo de las dos formas de glutatión en las especies estudiadas.

- Cuantificar las cantidades de ROS producidas en los diversos órganos y tejidos del organismo durante los periodos de estrés y recuperación podría ser otro de los experimentos que se podría realizar. Lo anterior permitiría entender de una mejor manera la función de la maquinaria antioxidativa y por lo tanto la variación en los niveles de GSH observados en el presente trabajo.

- En trabajos posteriores, el acocil podrá ser utilizado como una especie centinela ya que es capaz de responder a las alteraciones que se producen en sus ambientes con cambios metabólicos y fisiológicos. Lo anterior se refiere a que en estos organismos podrán ser probados diferentes agentes que se consideran estresantes, como lo son, por ejemplo, ciertos contaminantes o incluso las variaciones en la temperatura y pH del agua en donde habitan.

-

El glutatión parece ser un buen indicador de la respuesta que los organismos presentan ante diversos tipos de estrés como lo son la luz y cierto tipo de contaminantes (Nies et al., 1991). Se sugiere, por lo tanto, la importancia de esta molécula al intentar entender el por qué de las distintas respuestas fisiológicas y por lo tanto de la distribución de los acociles, en particular y de otros organismos en general.

•

Finalmente, los resultados del presente y otros trabajos así como la bibliografía revisada sugieren la importancia de comprender los mecanismos antioxidativos con los que todos los organismos contamos. Lo anterior es debido a que las ROS intervienen en la causa y la progresión de numerosas enfermedades así como también en los procesos de cansancio y envejecimiento. Por ello debemos entender de una mejor manera cómo es que ciertos factores ambientales alteran la fisiología y el metabolismo en general y los mecanismos antioxidativos en particular.

Literatura Citada

La imaginación es mas importante que el conocimiento

A. Einstein

XI. Literatura Citada.

- **Abramowitz A., F.L. Hisaw y D.N. Papandrea.** (1944). The occurrence of diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. *Biol. Bull.* 86:1-5.
- **Almar M. M., Diaz-Mayans J. y Romero F.J.** (1987). Glutathione and GSH Transferase activity in midgut gland of *Procambarus clarkii*. Sex differences, the effect of fasting, and their implications in cadmium Toxicity. *Comp.Biochem. Physiol.* Vol. 87C, No. 2, pp. 433-435.
- **Ahmad Sami.**(1995). Oxidative Stress and antioxidant defenses in Biology. International Thomson Publishing. New York. pags 457.
- **Anderson S.J., Taylor A.C. y Atkinson R.J.A.**(1994) Anaerobic metabolism during anoxia in burrowing shrimp *Calocaris macandreae* (Crustacea: Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A 515-522.
- **Anderson, M.E. y Meister, A.**(1980). A Dynamic state of glutathione in blood plasma. *J.Biol.Chem.*, 255,9530.
- **Aréchiga, H.**(1983). "Los ritmos biológicos", en *Del Tiempo: Cronos, Freud, Einstein y los genes.* Folios Ediciones. México.
- **Arrik B.A. y Nathan, C.F.** (1984). Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review, *Cancer Res.*, 44, 4224.
- **Aschoff J.** (1981). A survey on Biological Rhythms. *Handbook of behavioral Neurobiology Vol 4. Biological Rhythms* 3-79 pp.
- **Barry S.W. y Giblin F.J.** (1983). Glutathione oxidation in Retina: Effects on Biochemical and Electrical Activities. *Exp.Eye. Res.* 36: 287-297.
- **Burbanck W.D., Edwards,J.P. y Burbanck, M.P.** (1948). Toleration of lowered oxygen tension by cave and stream crayfish. *Ecology* 29: 360-367.
- **Castañón-Cervantes O, Lugo C, Aguilar M, González G y Fanjul-Moles M.** (1995). Photoperiodic induction on the growth rate and gonads maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 110 A, No. 2, pp 139-146.
- **Commitee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms.** (1975). *Ecol. Res. Report.* Environmental Protection Agency, U.S.A. EPA-660-/3-75-009.
- **Cooke I.M y Sullivan, R.E.** (1982). Hormones and neurosecretion. En *Atwood, H.L. y Sandeman, D.C. (eds) The biology of Crustacea, Vol. 3, Neurobiology: structure and function,* pp.205-90. Academic Press, New York.
- **Cohn V.H. y Leyle J.** (1966). *Anal. Biochem.* 14, 434.
- **Dall W. y Moriarty D.J.W.** (1983) Functional aspects of nutrition and digestion. En *Mantel, L.H (de) The Biology of Crustacea, Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation,* pp. 215-61. Academic Press, New York.
- **Dejours P. y Armand J.**(1980). Hemolymph acid-base balance of the crayfish *Astacus leptodactylus* as a function of the oxygenation and the acid-base balance of the ambient water. *Respiration Physiology* 4: 1-11.
- **Dejours P. y Beekenkamp H.** (1977). Crayfish respiration as a function of water oxygenation. *Respiration Physiology* 30:241-251.

- **De Meyts E.R.**, Minuyen Chang M.S., Robinson T.W. (1992). Transfection with γ -Glutamyl Transpeptidase Enhances Recovery from Glutathione Depletion Using Extracellular Glutathione. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114, 56-62.
- **De-Rey-Pailhade J.** (1888). *J. Compt. Rend. Acad. Sci*, 106, 1683-1684.
- **Drach P.**(1939). Mue et cycle d'intermude chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Océanog. Paris* 19: 103-391.
- **Dolphin D.**, Poulson R. y Avramovic O. (1989). *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects* (Wiley, New York), Partes A y B.
- **Dylock A.T.** (1995). Safety of antioxidant vitamins and B-carotene. *Am.J.Clin.Nutr.*,62(Suppl.),1510S-1515S.
- **Eckert R.**, Randall D., y Augustine G.(1995). *Animal Physiology. Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman and Company. NewYork.668 pags.
- **Ellington W.R.** (1983). The Recovery From Anaerobic Metabolism in Invertebrates. *Journal Exp Zoology* 228: 431-444.
- **Escamilla Chimal E.G.** Cambios en inmunoreactividad a la serotonina en la retina del acocil *Procambarus clarkii* durante el desarrollo. (Tesis). UNAM. (1997).
- **Fahey R.C.** et al. (1984). *Science* 224, 70-72.
- **Fanjul-Moles M.L.**.,Bosques T. T., Prieto S.J., Castañón C.O. y Fernández R.L. (1998). Effect of Variation in Photoperiod and Light Intensity on Oxygen Consumption, Lactate Concentration and Behaviour in Crayfish *Procamabrus clarkii* and *Procambarus diguetii*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 119 A, No.1, pp. 263-269.
- **Fingerman M.**(1955). Factors influencing the rate of oxygen consumption of the dwarf crayfish *Cambarelus shufeldtii*. *Tulane Stud. Zool.* 3: 103-116.
- **Fox H. M.**(1955). The effect of oxygen on the concentration of haem in invertebrates. *Proc. Roy. Soc.* B143:203-214.
- **Fox H. M.** (1936). The activity and metabolism of poikilothermal animals in different latitudes. *Proc.Zool. Soc. London* 1936(2):945-955.
- **Foyer C.H.**, Lelandais M., y Kunert K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- **Gäde G.** (1983). Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish *Oronectes limosus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, in press.
- **Goldsmith T.H.**(1972). The Natural History of Invertebrate Visual Pigments En: *Handbook of sensory Physiology*. H.J.A. Dartnall. Springer-Verlag, Berlin, 7, Part. I. pp. 685-719.
- **Griffith O.W.** y Meister, A. (1979). Glutathione: Interorgan Translocation, turnover and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 5606-5610.
- **Halliwell B.**, Gutteridge J.M.C., y Cross C.E.(1992). Free radicals, antioxidants and human disease: Where we are now?. *J.Lab.Clin. Med.*, 119, 598-620.
- **Hermann H.** y Moses, S.G. (1945). Content and state of glutathione in the tissues of the eye. *J.Biol.Chem.* 158, 33-45.

- **Hervant F., Mathieu J., Garin D y Fréminet A. (1995).** Behavioral, ventilatory and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorodanensis* and the epigeal *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol. Zool.* 68, 223-244.
- **Hissin P.J. y Hilf R. (1976).** A fluorometric method for determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Analytical Biochemistry* 74: 214-226.
- **Hochanka P.W. y Guppy M. (1987).** Metabolic arrest and the control of biological time. Harvard University Press Inc., New York, 227 pp.
- **Hogger J.B. (1988).** Ecology, population Biology and Behaviour. En: *Freshwater Crayfish, Biology, Management and Exploitation. Part I: General Biology.* Holdich D.M. y Lowery R.S. Timber Press, pp. 114-144.
- **Holdich D.M. y Lowery R.S. (1988).** Functional morphology and anatomy. In D.M. Holdich y R.S Lowery *freshwater crayfish: biology, management and exploitation*, Croom Helm, London 11-51 pp.
- **Holdich D.M., Reeve I.D. (1988).** Functional Morphology and Anatomy. En: *Freshwater Crayfish, Biology, Management and Exploitation. Part I: General Biology.* Holdich D.M. y Lowery R.S. Timber Press, pp. 114 -144.
- **Huner J.V. (1988).** *Procamabrus* in North America and elsewhere. En D.M. Holdich and R.S. Lowery (eds) *Fresh water crayfish: biology, mangement and exploitation* pp. 239-61. Croom Helm, London.
- **Jallier I.H. y Walsh P.J. (1992).** Metabolism of isolated hepatopancreas cells from the blue crab (*Callinectes sapidus*) under stimulated postexercise and hypoxic conditions. *Physiological Zoology* 65(4):712-723.
- **Jay F. H. y Cadenas E. (1997).** Oxidative Stress and Signal Transduction. International Thomson Publishing, NewYork. pags 474.
- **Kimball R. E., Reddy K., Peirce T.H., Shwartz, L.W., Mustafa M.G. y Cross C.E. (1976).** Oxygen toxicity: Augumentation of antioxidant mechanisms in rat lung. *Am. J. Physiol.* 230, 1425-1431.
- **Lash et al. (1986).** *Biochem J.* 205. 371-376.
- **Larson A., Orrenius S., Holmgren A., y Mannervik. (1983).** Functions of glutathione:
Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects. Raven Press. New York.
- **Lieberman M.W., Barrios Roberto., Carter B.Z. (1995)** γ -Glutamyl Transpeptidase. What does the Organization and Expression of a Multipromoter Gene Tell Us about its Functions. *American Journal of Pathology.* Vol 147, No. 5. Pp. 1175-1185.
- **Lieberman M.W., Wiseman A.L., Zheng-Zheng Shi. (1996).** Growth retardation and cysteine deficiency in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci.* Vol 93, pp. 7923-7926.
- **Lew H., Pyke, S., y Quintanilla., (1985).** Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive excersie in rats. *FEBS Lett.*, 185, 262.
- **Lockwood A.P.H. (1967).** *Aspects of the Physiology of Crustacea.* W.H freeman and Company. E.U.

- **Lyon R.** y Simkiss, K. (1984). The ultrastructure and metal-containing inclusions of mature cell types in the hepatopancreas of crayfish. *Tissue Cell*, 16, 805-17.
- **Mainard D.M.** (1962). Organization of Neuropil. *Zoologist*, 2, pp 79-96.
- **Mainard DM.** (1965). Integration in Crustacean Ganglia. *Symp Soc Exp Biol*, 20, pp.111-149.
- **Mainard D..M.** (1960). Circulation and heart function. En Waterman, T.H. *The Physiology of Crustacea I*, pp. 161-226. Academic press, New York.
- **Martensson J., Jain A., y Meister A.** (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 1715-1719.
- **Martensson J., Jain A., Stole E., Frayer W., Auld P y Meister A.** (1991) Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: A model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol 88*, pp. 9360-9364.
- **Martenson J., Steinherz R., Jain A., Meister A.** (1995). Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine-induced cataracts and lens epithelial cell damage. *Proc. Natl Acad Sci 86: 8727-8731.*
- **McDonald D.G., McMahon B.R. y Wood C.M.** (1977).
Patterns of heart and scaphognatite activity in the crab *Cancer magister*.
J. Exp. Zool. 202:33-44.
- **McLaughlin P.A.** (1983). Internal Anatomy. En Mantel, L.H. (de) *The biology of Crustacea Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation*, pp. 1-52. Academic Press, New York.
- **McMahon B.R.** (1986). The adaptable crayfish: mechanisms of physiological adaptation. *Freshwater Crayfish*, 6, 59-74.
- **Meister A.** (1983). Functions of glutathione. *Biochemical, Physiological and Toxicological aspects.* Raven Press. New York. pp. 1-22
- **Meister A.** (1988). Novel Drugs that Affect Glutathione Metabolism in Mechanisms of Drug Resistance in neoplastic Cells en *Bristol-Myers Symposium.* Academic Press Inc. Chapter 7. pp. 99-126.
- **Meister A.** (1988). Modulation of Glutathione Levels and Metabolism en second International Conference of Anticarcinogens and Radiation Protection. Plenum Press.
- **Mesiter A. y Anderson M.E.** (1983). *Ann. Rev. Biochem.* 52, 707-711.
- **Moberg G.P.** (1985). *Animal Stress.* American Physiological Society. Bethesda Maryland. Pags 324.
- **Momot W.T., Gowing H. y Jones, P..D.** (1978). The dynamics and their role in the ecosystem. *Am.Midl. Nat.*99,10-35.
- **Monier J.A.E.** (1936). Recherches sur la répartition du glutathione dans les organes del animaux inférieurs. Tesis Doctoral. Univeristé de Bordeaux.
- **Nassel D.R.** (1992). The Retina and Retinal Projection on the Lamina Ganglionaris of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J.Comp. Neurol*, 167pp.341-360.
- **Ninneman H.** (1970). Inhibition of respiration in yeast by light. *Biochim. Biophys.*205: 499-506.
- **Nies E.,Almar M..M., Hemenegildo C., Monsalve E., y Romero F.** (1991)
The Activity of Glutathione S-Transferase in Hepeatopancreas of

- Procambarus clarkii*: Seasonal variations and the influence of environmental pollutants. Comp. Biochem. Physiol. Vol 1 pp. 65-66.
- **Page T.L.** y Larimer J.L. (1975). Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish. The Locomotor activity Rythm. J. Comp Physiol, 97, pp. 59-80.
 - **Penn G.H.** (1943). A study of the life history of the Louisiana red crawfish, *Cambarus clarkii* Girard. Ecology, 24, 1-18.
 - **Prosser L.C.** y Brown F.A. 1991. Environmental and Metabolic Animal Physiology. Wiley-Liss Press. New York. pp. 575
 - **Ragnekar P.V.** (1954). A comparative study of the blood volume in the crustaceans *Scylla serrata*, *Panulirus polyphagus*, and *Parathelpeusa guerini*. J. Animal Morphol and Physiol. 1:62-64.
 - **Reim M.**, Heuvels B. y Cattepoel H. (1974). Glutathione peroxidase in some ocular tissues. Ophthalmic Res. 6, 228-34.
 - **Rice R.P.** y Armitage B. K. (1974). The effect of photoperiod on oxygen consumption of the crayfish *Oronectes nais*. Comp. Biochem. Physiol. Vol 47A: 261-270.
 - **Richman P.G.** y Meister A. (1975). Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. J. Biol. Chem. 250, 1422-1426.
 - **Rogers R.** y Huner J.V. (1985). Comparison of burrows and burrowing behaviour of five species of cambarid crayfish from the Southern University campus, baton Rouge, Louisiana. Proc. Louisiana Acad Sci., 48, 23-9.
 - **Rose R.D.** (1986). Chemical detection of "self" and conspecifics by crayfish.. J. Chem. Ecol. 12, 271-6.
 - **Ross E. W.** (1983). The recovery from anaerobic metabolism in Invertebrates. The Journal of Experimental Zoology 228:431-444. Company. London. pags. 688.
 - **Rudolph P.H.** y Spaziani E. (1990). Distribution of serotonergic Neurons in the Eyestalk and Brain of the crab, *Cancer antennarius*. Comp. Biochem Physiol, 97C(2). Pp. 241.245.
 - **Ruiz Y. S.** Estudio de una posible fase fotoinducible en el desarrollo gonadal del acocil *Procambarus clarkii*. (Tesis). UNAM. 1996.
 - **Sandeman D.C.** (1990). Structural and Functional Levels in the Organization of Decapod Crustaceans Brains. Frontiers in Crustacean Neurobiology. Advances in Life Science, pp. 223-239.
 - **Schick J.M.**, Widdows J. Y Gnaiger E. (1988). Calorimetric studies of behavior, metabolism and energetics of sessile intertidal animals. Amer. Zool. 28:161-181.
 - **Schmidt-Nielsen K.** (1994). Animal Physiology. Adaptation and Environment. Cambridge Press. USA. pp. 602.
 - **Scholander P.F.**, Flagg W., Walters V., e Irving L. (1953). Climatic adaptations in arctic and tropical poikilotherms. Physiol. Zool. 26: 67-92.
 - **Schroff G.** y Schottler U. (1980). Anaerobic metabolism in *Arenicola*. J. Comp. Physiol. 138:35-41.
 - **Scudamore H.H.** (1947). The influence of the sinus glands upon molting and associated changes in the crayfish. Physiol. Zool. 20: 187-208.

- **Singh R. y Pathak D.N.** (1990). Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dimutase, catalase and glucose 6-posphate dehydrogenase activities in FeCl₃-induced epileptogenic foci in brain. *Epilepsia*, 31, 15-36.
- **Seliger H.H y McElroy W.D.** (1965). *Light: Physical and Biological Action*. Academic Press. N.Y. pags. 248-268
- **Shaw S.R. y Stowe S.** (1982). Photoreception. En: *The Biology of Crustacea. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function*. Bliss D.E., Atwood H.L. y Sandeman D. Academic Press, New York, pp. 292-356.
- **Speck U. y Ulrich K.** (1970). Das Schicksal der Natrstaffe bei dem Flusskrebs *Oreonectes limosus*. *Z. Verg Physiol.*, 68, 318-33.
- **Tarr M. y Samson F.** (1993). *Oxygen Free Radicals in Tissue Damage*.
- **Tashian R.E.** (1956). Geographic variation in the respiratory metabolism and temperature coefficient in tropical and temperate forms of fildder crab, *Uca pugnax*. *Zoologica* 41:39-47.
- **Tietze F.** (1969). *Anal Biochem.* 27, 502.
- **Villalobos A.**(1983). *Crayfishes of Mexico (Crustacea:Decapoda)*. Amerind Publishing. NewYork.Chapman and Hall. NewYork. Pags 295.
- **Vernberg F.J.** (1956). Study of the oxygen consumption of excised tissues of certain marine decapod Crsutacea in relation to habitat. *Physiol. Zoöl.* 29:227-234.
- **Waterman T. H.** (1960). *The Physiologie of Crustacea. Metabolism and Growth. Vol I.* Acedemic Press. NewYork. Pags. 670.
- **Waterman T. H.** (1960). *The Physiologie of Crustacea. Sense Organs, Integration and Behavoieur. Vol.II.* Acedemic Press. NewYork. Pags. 670.
- **Whitemore C.M., Warden C.E. y Doudoroff P.** (1960) Behaviour of fish in an oxigen gradient. *Trans. Am. Fish. Soc.* 89:17-26.
- **William B. S.** (1989).Metabolic adaptations of several species of crustaceans and molluscs to Hipoxia. Tolerance and microcalorimetric studies. *Zoology and Physiology*.
- **Wimberger P., Ebner S., Maringrez M.** (1997). Reduced glutathine inhibits rabbit and rat skeletal muscle lactate deshydrogenase and prevents dinitrophenol induced extracellular acidification by an epithelial cell line. *Life Sci.* 61 (4): 403-409.
- **Wolvekamp H.P. y Waterman T.H.** (1960). *The Physiologie of Crustacea. Vol I. Chapter 2.* Academic Press. Londres. Pags. 670