



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

28  
zej

*Facultad de Ciencias*

**Variaciones en la concentración de ácido láctico  
y consumo de oxígeno en dos especies de acocil  
sometidas a un posible estrés lumínico**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA:**

**TERESA MARIA BOSQUES TISTLER**

México, D.F.

1993

**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 está 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 MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

Facultad de Ciencias

"Variaciones en la concentración de ácido láctico  
y consumo de oxígeno en dos especies de acocil  
sometidas a un posible estrés lumínico"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO PRESENTA:

TERESA MARIA BOSQUES TISTLER

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA COMPARADA, DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, FACULTAD DE CIENCIAS, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. M<sup>a</sup> LUISA FANJUL DE MOLES Y EN EL LABORATORIO N<sup>o</sup> 9 DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, FACULTAD DE MEDICINA, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. LEONOR FERNANDEZ RIVERA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

\* Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo, en especial a la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Fanjul por la orientación y dirección de este trabajo, a la Dra. Leonor Fernández Rivera por la dirección de los análisis bioquímicos, a los sinodales; M. en C. Jorge Luis Hernández, Dra. Margarita García y M. en C. M<sup>a</sup> Eugenia Gonsebatt por la revisión de esta tesis, a Fernando Colchero por su invaluable ayuda, a Silvia Adams, a Manuel Miranda, a Aquiles Bernal, a Julio Prieto, por su asesoría en los análisis estadísticos, a Virginia Inclán Rubio, por la facilitación de organismos *P. digueti*, a Jesús Sáenz, a Mercedes y Marcelino Perelló, a Alejandro Martínez Mena y a su equipo de trabajo por todo el apoyo brindado.

## INDICE:

Págs.

Resumen..... 1

### Antecedentes:

a) Diagnósis del Orden Decapoda..... ii

b) Taxonomía de *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti*..... iii

c) Características de los habitats de las dos especies estudiadas..... iii

### I. Introducción:

1.1 Definición biológica de estrés..... 1

1.2 Factores de estrés y su compensación..... 3

II. Luz: Generalidades..... 5

2.1 Fotoperiodo como factor estresante..... 6

### III. Metabolismo

3.1 Definición de metabolismo..... 10

3.2 Formación de lactato..... 11

3.3 Metabolismo en crustáceos decápodos y su regulación hormonal..... 13

a) generalidades

b) la hormona hipergluce miante

3.4 Anaerobiosis facultativa como un factor de adaptación..... 17

3.5 Hemolinfa:..... 18

a) características

b) transporte de O<sub>2</sub>

c) transporte de CO<sub>2</sub>

IV. Hipótesis.....	22
V. Objetivos .....	23
VI. Material y métodos.....	23
VII. Resultados.....	27
VIII. Discusión y conclusiones.....	33
IX. Literatura consultada.....	42

## RESUMEN

- 1) En este trabajo se investigó si la incidencia de la duración de la luz sobre dos especies de acoíl, *Procambarus clarkii* y *P. digueti* puede ser un factor de estrés.
- 2) Con el objeto de cuantificar este posible estrés se utilizaron dos tipos de respuestas; la concentración de ácido láctico en hemolinfa y el consumo de oxígeno a 1 y a 2 semanas de exposición.
- 3) Para comprobar lo anterior, se colocaron 20 organismos de cada especie bajo dos condiciones de duración luminosa diferentes (Luz/Obscuridad 12:12 y L/O 20:4), siempre a la misma intensidad.
- 4) Ambas especies mostraron un incremento en la concentración de lactato al exponerlas a 20 horas de luz durante 1 semana pero la relación entre el lactato y el consumo de  $O_2$  fué diferente para cada especie: *P. clarkii* utilizó ambas vías y *P. digueti* mostró una relación inversamente proporcional entre la producción de lactato y el consumo de  $O_2$ . A la 2ª semana de exposición, *P. clarkii* mostró una relación lactato-oxígeno inversamente proporcional, aumentando la producción de lactato, lo cual indica un aumento en las vías anaeróbicas. *P. digueti* no sostuvo su posibilidad de anaerobiosis por más tiempo y el efecto de la luz fué letal.
- 5) Se encontró que el aumento en la duración de la luz de intensidad alta puede considerarse como un factor de estrés.

## a) Diagnósis del Orden Decapoda.

En este Orden se encuentran los organismos más grandes y más conocidos de la Clase Crustacea. Se caracterizan principalmente por tener un cefalotórax con los tres primeros segmentos del pereión unidos a la cabeza, por lo que tienen tres pares de maxilípedos, lo que hace que los pereiópodos queden reducidos a cinco pares libres; de aquí el nombre de decápodos: Son eucáridos con aspecto carioide, si bien este puede estar muy modificado, el exopodito de la maxila es grande (escafognatito); las branquias forman series, una unida a los coxopoditos de los pereiópodos (podobranquias) que son transformaciones de los epipoditos; otra serie parte de la membrana articular (artrobranquias) y la otra que se encuentra en las paredes laterales de los segmentos del pereión (pleurobranquias). Sus tamaños varían mucho, desde 3 a 5 mm hasta 40 cm o más (*Macrocheira kaempferi* tiene un cefalotórax de 40 cm y quelípodos de hasta 4 m de envergadura).

Presentan grandes corazas dorsales que se fusionan a los segmentos cefálicos y a los pereiópodos y cubren lateralmente la cavidad branquial en donde el movimiento del apéndice laminar de las segundas axilas sostiene una circulación constante de agua; la parte anterior del caparazón se prolonga en la espina llamada rostro, que en muy pocos es movable; la superficie del caparazón se encuentra generalmente marcada con depresiones y excrescencias que corresponden en parte a la inserción de los músculos. En la región



correspondiente al límite entre la porción cefálica y el pereión se encuentra el llamado surco cervical o surco branquial, que indica la línea divisoria entre las porciones del carapacho que salen de los somitas, antenal y mandibular, respectivamente. El pleón varía mucho en su forma, razón por la cual puede utilizarse para fines de clasificación.

**b) Taxonomía de *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti***

*Procambarus clarkii* y *P. digueti* se ubican taxonómicamente en el Phylum Arthropoda, Clase Malacostraca, Sub-clase Eumalacostraca, Super-orden Eucarida, Orden Decapoda, Sub-orden Pleocyemata, Infraorden Astacidea, Superfamilia Astacoidea, Familia Cambaridae, género *Procambarus* (Bowman & Abele, 1982). (ver fig. 1)

**c) Características de los habitats de las dos especies estudiadas.**

\* La especie *clarkii* Girard, se encuentra distribuida naturalmente en Norte América, especialmente al NW de México y al Centro-Sur de Estados Unidos. Ocupa todo tipo de habitats incluyendo sitios subterráneos, praderas húmedas, ciénegas y cuerpos de agua estacionales, así como ríos y lagos permanentes. En su habitat natural es común encontrarlo en pantanos de estación lluviosa y ciénegas en donde el período de secas tiene por lo menos tres funciones: El dejar crecer vegetación anual que provee alimento y refugio cuando esas áreas se recubren de agua, la

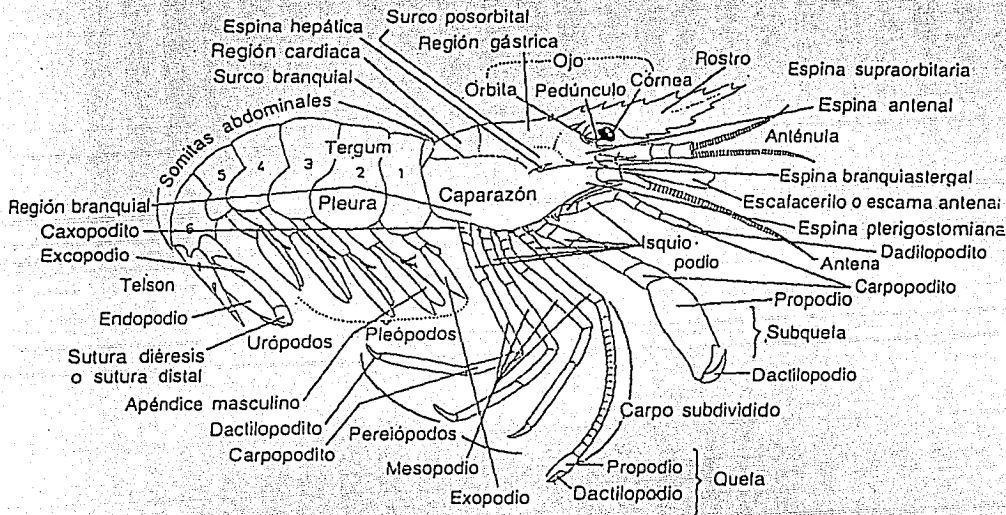


Fig. 1 Dibujo esquemático de la morfología externa de un malacostráceo. (En parte según Schmitt, redibujado por Villalobos.)

eliminación de depredadores acuáticos y la reducción de sedimentos anaeróbicos. Sin embargo, esta especie puede encontrarse en todo tipo de cuerpos de agua, incluyendo ríos de truchas, cultivos de arroz, lagos y en canales de irrigación (Holdich, 1988).

\* La especie *digueti* Bouvier, es endémica de México, teniendo como localidad tipo el estado de Jalisco y encontrándose también en el estado de Michoacán; ocupa habitats poco profundos y bien aereados, como corrientes y arroyos, lagos y el borde de ríos.

## I. INTRODUCCION

### 1.1. Definición de estrés.

Uno de los factores determinantes en la vida de todo ser vivo es el ambiente que lo rodea y en el cual se desarrolla. El interés por las influencias ambientales sobre los seres vivos encuentra su origen en dos líneas conspicuas de pensamiento; la médica, iniciada por Hipócrates y la teórica, iniciada por Darwin. Hipócrates investigó los efectos del tiempo y el clima en el ser humano e ideó el primer grupo de principios sobre el concepto hombre-ambiente. Cientos de años después, el concepto de Hipócrates se fué perdiendo se reemplazó por un enfoque basado en la enfermedad como una característica aislada sin tomar en cuenta al medio. Hoy en día, el punto de vista holístico sobre la salud está en boga nuevamente, lo que nos une al viejo concepto de interrelación hombre-ambiente (Folk, 1974). Por otra parte, la visión teórica de Darwin enfatizó las interrelaciones de los seres vivos con su ambiente físico; el estudio de esta área fué denominado por Haeckel en 1866 como Ecología (Oikos= casa, logos= estudio de). Esta ciencia se subdividió por razones prácticas en varias disciplinas; el área de estudio que tiene que ver con el estrés fisiológico es la fisiología ambiental, el estudio de esta área se puede llevar a cabo tanto en el medio en el que vive el sujeto como en condiciones de laboratorio para que las variables ambientales puedan ser controladas y que las respuestas específicas que provoca sean definidas (Folk, op.cit.).

Los factores ambientales pueden ser considerados como factores de estrés cuando sus efectos provocan alteraciones en un ser vivo, entendiéndose como una situación de estrés al conjunto de factores ambientales que pueden producir una alteración desfavorable fisiológica teniendo como consecuencia una compensación fisiológica, la que es traducida por el cambio en uno o varios valores de variables fisiológicas, que van a permitir al organismo adaptarse y sobrevivir a las condiciones adversas; la presión ambiental que requiere de una compensación fisiológica se denomina estrés en el idioma inglés (Hoar, 1983).

El estrés puede dar lugar a una adaptación por parte del organismo afectado, es decir, una compensación funcional a un factor ambiental en un período corto de tiempo (Eagan, 1963). El intervalo de situaciones de estrés va desde todos los tipos de trauma y condiciones adversas del medio hasta una excesiva estimulación social. Los factores ambientales se pueden clasificar con base en los tipos de acción que ejercen sobre el organismo, desde los cambios leves hasta los niveles letales, es decir, que lleguen a alterar al metabolismo de un animal hasta la muerte o que modifiquen u orienten su comportamiento. Estos efectos los clasifica Fry (1973) en 5 categorías:

- 1) **Letales:** Cuando una variable ambiental actúa de manera irreversible destruyendo la integridad de un organismo provocándole la muerte. Para identificarlos, hay un nivel *letal incipiente*

después del cual un organismo no sobrevive y un *tiempo efectivo* requerido para producir el efecto del primero.

2) **Controladores:** Factores ambientales que regulan las tasas metabólicas por su influencia en la activación molecular vinculada con cambios metabólicos. Por ejemplo: Temperatura, presión y p.H.

3) **Limitantes:** También rigen las tasas metabólicas pero por influencia en el suministro o eliminación de metabolitos. El suministro de  $O_2$  puede ser una limitante en la respiración de un animal en tanto que la fotosíntesis está limitada por la luz.

4) **De enmascaramiento;** Cuando el efecto modifica o previene la acción de otra variable se dice que enmascara. El efecto de la humedad en nuestra temperatura corporal es un ejemplo familiar.

5) **Directivos:** Cuando guían los movimientos o alteran las actividades de un animal. Actúan en blancos específicos tales como los órganos de los sentidos en las respuestas de orientación o en el control del fotoperiodismo (i.e. respuestas a los cambios estacionales de la luz).

## 1.2 Factores de estrés y su compensación:

Es poco común que un organismo se encuentre en la naturaleza bajo condiciones ambientales estables; en efecto, los diferentes habitats pueden presentar variaciones en el aporte de alimento así

como oscilaciones diurnas y estacionales debido a los cambios de luz y de temperatura; con base en estas variaciones, muchos organismos alteran sus tasas metabólicas. En los animales, las compensaciones fisiológicas a los cambios en las variables ambientales presentan un cierto intervalo de variación. La variable puede ser la temperatura, la humedad, el aporte de  $O_2$  o cualquier otro factor. Los animales tienen la capacidad de compensar cualquier cambio en una variable ambiental siempre que no exceda los límites de la tolerancia, al exceder estos límites el animal se verá lesionado; donde resiste el cambio durante un cierto período de tiempo y eventualmente sucumbe. Por lo que cada organismo tiene una cierta capacidad de tolerancia y de resistencia (Hoar, 1983).

Los principales factores reportados cuyos cambios extremos pueden ocasionar reacciones de estrés en los organismos animales son la hipoxia, la hiperoxia, la falta de alimentación, variaciones en la temperatura, en la salinidad, etcétera, pero pocos son los consideran al fotoperiodo como un posible factor de estrés.

Un organismo no sólo posee las capacidades de tolerancia y de resistencia sino también de aclimatación y aclimatización. Esto significa que las condiciones previas con respecto a cualquier factor pueden modificar la subsecuente tolerancia y/o resistencia por parte del organismo. La aclimatación se refiere a los cambios de compensación que ocurren bajo condiciones controladas de laboratorio y generalmente se toma en cuenta

únicamente una variable, mientras que la aclimatización se lleva a cabo bajo condiciones naturales y es la suma de los ajustes que le siguen a una exposición repetida y prolongada a los cambios naturales en el medio (Hoar, 1983).

## II. Luz. Generalidades.

La vida en nuestro planeta depende de la fuente de energía proveniente de la radiación solar. Cuando un fotón (i.e. un paquete de quanta de energía luminosa) llega e interactúa con partículas de materia, manda un electrón a un nivel de energía superior o a un estado excitado. Estos electrones regresan a su estado original después de  $10^{-7}$  seg; pero durante este efímero intervalo, proveen la energía que pone en marcha a la maquinaria de la vida. Substancias bioquímicas altamente eficientes se encargan de capturar los electrones excitados, los desacoplan y les permiten regresar a su estado original a través de una secuencia de reacciones de energía libre (Hoar, 1983). Cada paquete de luz o fotón tiene un contenido de energía el cual puede calcularse por su longitud de onda mediante la fórmula de Plank;  $E=h\nu$ , en donde  $h$ = la constante universal de Plank ( $1.58 \times 10^{-34}$  cal sec),  $c$ = velocidad de la luz ( $3 \times 10^{10}$  cm/sec), y  $\lambda$  es la longitud de onda. La ley de Einstein sobre la equivalencia fotoquímica muestra que las reacciones fotoquímicas se dan sólo cuando una molécula absorbe un fotón. Puede esperarse que una molécula de substancia (conteniendo  $6.02 \times 10^{23}$  partículas) absorba una mol de fotones en una reacción fotoquímica. La energía de este número de fotones es el Einstein



que equivale a  $2.854 \times 10^7$  g-cal. Por lo tanto, se puede calcular la energía asociada con la luz a diferentes longitudes de onda o, a la inversa, longitud de onda o radiación que corresponde a la energía de activación para las reacciones químicas

La vida existe y opera en una banda relativamente estrecha de este espectro. La banda estrecha a la que llamamos luz (por la sensación que crea cuando llega a la retina del ojo humano) se encuentra entre los 380 y los 760 nm. Esta banda particular de energía llamada luz controla todos los procesos fotobiológicos importantes: fotosíntesis, fotoperiodismo, visión, fototropismo, fototaxis, etc. (ver fig. 2)

### 2.1 Fotoperiodo como factor estresante

La influencia de la duración de la fase luminosa (fotoperiodo) en un organismo animal vivo es de suma importancia; el contraste diario entre la luz y la obscuridad actúa como punto de referencia temporal en la mayoría de los organismos. Este contraste tiene una ampliación geográfica cerca de los polos, en donde se presentan periodos alrededor de los solsticios de total obscuridad y/o total luminosidad. A medida en que se va acercando al Ecuador (en espacio) y a los equinoccios (en tiempo), este periodo se va acortando y la duración luz/obscuridad va equilibrándose.



Tanto como la calidad y la intensidad de luz, la duración de ésta influye mucho en los seres vivos; se han investigado los efectos del fotoperiodo en plantas y animales desde siglos atrás, describiendo por ejemplo los cambios en la apertura y cierre de las corolas durante los cambios diurnos de luz (cf. "el reloj florístico" de Carl Von Linné (1748), los experimentos de Decandolle, etcétera), la germinación de semillas, el crecimiento y formación de bulbos, el periodo de reproducción en animales; su crecimiento gonadal, su comportamiento sexual, social y las repercusiones de estos cambios en el metabolismo durante los cambios estacionales de luz: Las larvas de los crustáceos muestran respuestas fototácticas y fotoquímicas bastante complicadas a los cambios de luz (Sastry, 1983). Larvas de diversos balanos, cangrejos marinos y estuarinos presentan una sensibilidad espectral en el rango de 500-600 nm (Barnes et al, 1972, Forward et al, 1978). Los estadios larvales de *Rhithropanopeus harrisi* muestran una polarotaxis en los estadios larvales II y IV (Forward, 1974): Estos estadios larvales parecen percibir la luz polarizada lineal y usarla como pista para orientarse y moverse verticalmente. La luz es el estímulo mayor referente a la orientación en las larvas de los cangrejos *Leptodius floridanus* y *Panopeus herbstii*. (Sulkin, 1973, 1975). La señal potencial más conocida para la sincronización circadiana es el ciclo luz/obscuridad dada por la rotación de la tierra. Cabe señalar que estos factores no tienen una connotación de estrés: El efecto de la cantidad y calidad de la luz como posible factor de presión ambiental ha sido poco explorado; Folk

(1974) considera la luz como un factor natural en el medio, entre otros, pero también considera que una exposición abrupta y extrema a uno de estos factores puede considerarse como hostil.

Dehnel (1958) reportó el efecto del fotoperiodo en la tasa metabólica en invertebrados marinos: El cangrejo *Hemigrapsus oregonensis* mostró un consumo de  $O_2$  más elevado al mantenerlo bajo un fotoperiodo L/O 8:16 que al estar bajo un régimen de luz 16:8 (L/O) o bajo obscuridad constante. *H.nudus* mostró también un incremento (aunque menos pronunciado) en su consumo de  $O_2$  bajo fotoperiodo 8:16 en comparación con el régimen 16:8 u obscuridad constante. La respuesta fué evidente después de una semana y persistió varias semanas después. Según este autor, el incremento en el consumo de oxígeno de estos cangrejos en condiciones de laboratorio expuestos a "días cortos" durante el verano puede significar un ajuste de su tasa metabólica a las condiciones de luz invernales. Sin embargo, Rice y Armitage (1974) no encontraron un efecto directo del régimen luz-obscuridad (L/O 5:8, 14:10 y el fotoperiodo natural de Kansas) en la tasa metabólica de *Orconectes nais* en ambos sexos. El metabolismo fué relativamente bajo y uniforme durante el día y el nocturno fué elevado.

La acción de la luz sobre los animales se ha estudiado poco pero el efecto de este factor a nivel celular ha merecido una mejor atención. Con respecto a la acción de la luz a nivel mitocondrial, Ninnemann et al. (1970) reportaron que la capacidad de respiración

en cultivos desnutridos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se inhibe por la irradiación de luz visible. Bajo luz monocromática (luz azul) y en condiciones aerobias, la velocidad de inhibición de la respiración es aún más rápida; la acción inhibitoria primaria de la luz azul en la respiración puede atribuirse a la fotodestrucción de la citocromooxidasa. Esto no sucede en condiciones anaerobias, ya que la irradiación no inhibe esta vías de obtención de energía. Matile & Frey-Wyssling (1962) reportaron que la luz blanca intensa inhibe el consumo de  $O_2$  en *S. cerevisiae* pero no la producción del  $CO_2$  y concluyeron que la luz inhibe algún proceso en el ciclo de Krebs. Rounds y Olson (1967) reportan el efecto de la luz visible intensa en la respiración celular; con base en las aseveraciones de que ciertos tejidos en cultivo son sensibles a fotones del espectro visible, los autores experimentaron en tejido nervioso de rata expuesto a diferentes longitudes de onda (430-440 nm {azul}, 546nm {verde}, 577 nm {naranja} y 600-610 nm {rojo}) y tiempos de exposición (de 15 min. a 2 hrs.). Los efectos relativos de las diferentes longitudes de onda en la respiración celular se dan de mayor a menor de la siguiente manera: 560-620 nm > 430-440 nm > 546 nm > 577 nm. Según estos autores, desde el momento en que el sistema citocrómico es el único componente molecular en las células cerebrales que presenta tanto actividad oxidativa como sensibilidad a las diferentes longitudes de onda del espectro visible, el papel de los citocromos está fuertemente implicado. Estos autores concluyen que la luz reduce la capacidad oxidativa de las células cerebrales en aproximadamente 60

% en el consumo basal de  $O_2$ .

### III. Metabolismo

3.1 definición: Es el conjunto de reacciones catalizadas por enzimas de las moléculas orgánicas en las células vivas (Lehninger, 1990); la totalidad de estos procesos químicos y físicos comprende tanto al anabolismo (i.e. la síntesis de sustancias complejas efectuada por las células vivas a partir de sustancias simples) como al catabolismo, (i.e. la degradación de moléculas complejas en otras más simples), Eckert (1991).

Aunque el metabolismo comprende a centenares de reacciones diferentes catalizadas por enzimas, las rutas metabólicas centrales son pocas en número y son idénticas en la mayor parte de las formas de vida (Lehninger, op.cit.). Los organismos heterotróficos (es decir, que subsisten consumiendo productos elaborados por otros organismos) comprenden a los aerobios y los anaerobios. Los aerobios viven en el aire y emplean el oxígeno molecular para oxidar las moléculas orgánicas que emplean como nutrientes. Los anaerobios viven en ausencia de oxígeno y degradan sus elementos nutritivos sin emplear el oxígeno. Muchas células, como las levaduras, pueden vivir tanto en ausencia como en presencia de  $O_2$ ; a estos organismos se les llama facultativos. La mayor parte de las células heterotróficas, particularmente en los organismos superiores, son facultativas, pero si disponen de  $O_2$  utilizan sus rutas aeróbicas para oxidar a sus nutrientes (Lehninger, Op. cit.).

La glucólisis es una ruta central del catabolismo de la glucosa para la recuperación de energía química en forma de ATP en la mayor parte de los organismos vivos; es casi universal ya que se presenta en animales, plantas y en muchos microorganismos y comprende 2 rutas metabólicas: La aerobia, cuyo producto final es  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y la anaerobia, que produce lactato.

### 3.2 Formación de lactato:

En el tejido muscular, el lactato es generado, como se mencionó anteriormente, por la conversión del piruvato en condiciones anaerobias (fig. 3). Cuando algunos tejidos animales deben funcionar anaeróbicamente, el piruvato no puede oxidarse más por la falta de  $\text{O}_2$ . Bajo estas circunstancias, el piruvato formado en la glucólisis se reduce a lactato. Las vías metabólicas se relacionan entre sí al integrarse al esquema general del metabolismo y una de ellas, la de los carbohidratos tiene como eje central a la glucólisis. En esta vía, la glucosa se cataboliza en el citosol de las células mediante una secuencia de reacciones catalíticas formando; 2 moléculas de piruvato, 2 de nicotinamida adenin dinucleótido reducido ( $\text{NADH}+\text{H}^+$ ) y 4 de ATP. Como gasto energético, se utilizan 2 moles de ATP por mol de glucosa. Una vez fosforilada, la glucosa es catabolizada hasta formar 2 triosas inconvertibles; la di-hidroxi acetona-fosfato y D-gliceraldehido 3 fosfato. Este último, después de varias reacciones enzimáticas, forma piruvato.

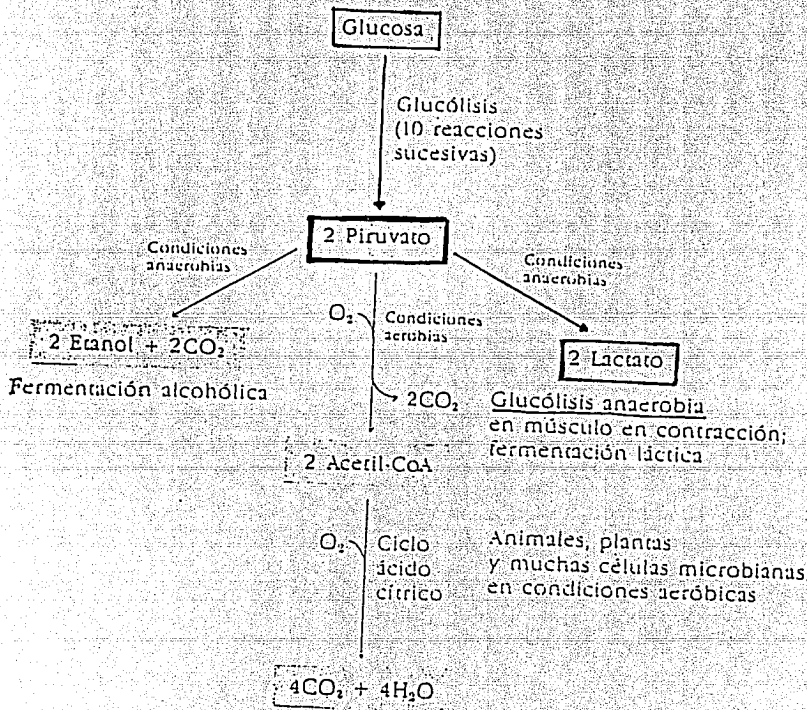


Fig. 3 Formación de lactato a partir de glucosa vía piruvato.



El funcionamiento muscular en condiciones anaerobias tiene cierta relevancia desde el punto de vista evolutivo, ya que dota a los organismos de una capacidad de respuesta inmediata y masiva de gran utilidad en condiciones de emergencia: El músculo estriado es un tejido clave para poder llevar a cabo reacciones exergónicas en ausencia de  $O_2$  pues su alta reserva de glucógeno tiene el significado de proveer glucosa para los procesos de la glucólisis anaerobia. Las condiciones metabólicas que lo caracterizan implican una alta demanda de energía. En estas condiciones el músculo produce cantidades importantes de lactato y genera poco ATP. Durante el ejercicio, las células del músculo esquelético funcionan bajo condiciones en las que el piruvato no puede ser metabolizado eficientemente en la mitocondria, aunque exista  $O_2$  disponible, al incrementarse la concentración de este alfa-ceto ácido en la célula muscular existen 2 alternativas metabólicas para el piruvato: por un lado, oxidarse a lactato o formar alanina por transaminación y por otro, que el lactato sea metabolizado en otro tejido. Esta 2ª opción se conoce como Ciclo de Cori, en el que se establece una interrelación entre el músculo y el tejido hepático. En los crustáceos decápodos, el hepatopáncreas acumula reservas orgánicas, especialmente glucógeno, que se destinan a los requerimientos energéticos que ocurren durante la muda; no se utilizan para el crecimiento general del tejido. La acumulación de reservas orgánicas caracteriza el estado C (i.e. el período de intermuda), ya que éstas serán utilizadas subsecuentemente en gran parte para formar un nuevo exoesqueleto. Claude Bernard fué el primero que

demostró un incremento en el glucógeno del hepatopáncreas antes de la muda, (Drach, 1939). Por otra parte, el L-lactato es el principal y prácticamente único producto terminal del metabolismo anaerobio en los crustáceos decápodos (Truchot y Lallier, 1992).

### 3.3 Metabolismo en crustáceos decápodos y su control hormonal

A) La regulación del metabolismo implica la interacción y el control de las vías metabólicas, cuyo principal resultado es adaptar el funcionamiento bioquímico del organismo a sus necesidades específicas. A largo plazo, incide en los fenómenos de adaptación de los organismos a su medio, entre otros.

Los músculos de los crustáceos han sido objeto de investigación metabólica desde principios de este siglo.

Meyerhof y Lohman (1927 En: Boyland, 1928) encontraron que después de estimular los músculos de los crustáceos, el glucógeno desaparece y una cantidad equivalente de ácido láctico se forma en un medio ligeramente alcalino. Por medio de fosfato secundario, todo el glucógeno contenido en los músculos puede ser convertido en ácido láctico. De este modo se probó que el último punto de la parte anaeróbica del metabolismo de carbohidratos de los músculos en los crustáceos es el mismo que en los vertebrados (Boyland, 1928). En los crustáceos se encontró una interdependencia entre la formación de ácido láctico y la utilización de glucógeno (en las langostas *Panilurus vulgaris* y *Homarus vulgaris*) en el músculo abdominal (Boyland, Op.cit.); éste autor menciona que la cantidad

de ácido láctico producida bajo condiciones distintas difiere entre especies. Como se ve, la conversión de glucosa a lactato en crustáceos es bien conocida, pero los aspectos cuantitativos de la vía glucolítica han sido menos investigados: Dedinger y Schatzlein (1973) midieron la producción y la concentración de lactato a partir de glucosa en los quelípedos y en el músculo torácico, branquias y hepatopáncreas de un crustáceo decápodo; *Pachigrapsus crassipes*. Como la fisiología de los crustáceos está estrechamente ligada con el ciclo de muda y esto se relaciona con cambios cíclicos en la utilización de glucosa y con el consumo de oxígeno (Mc Whinnie y Kirchenberg, 1962. En: Dedinger, 1973), Dedinger et al. investigaron las tasas glicolíticas en los quelípedos, músculos torácicos y en las branquias de este decápodo y encontraron que correspondían a 14, 10 y 7  $\mu$ moles de lactato por gramo de tejido respectivamente. En el hepatopáncreas encontraron poca actividad glicolítica relacionada con los cambios debidos al ciclo de muda. No se detectaron diferencias en la formación de lactato. Sin embargo, se han detectado ritmos diurnos en el metabolismo de los carbohidratos en *Euphasia superba dana* (Mezykowski, 1979) en donde el contenido de glucosa y ácido láctico en el hepatopáncreas muestra cambios circádicos; en la fase activa (nocturna) hay un decremento de glucógeno y durante la fase pasiva (diurna) hay un incremento. Los cambios en el contenido de carbohidratos están relacionados con la reserva energética del organismo. Al parecer, el decremento inicial de glucosa en la hemolinfa durante un experimento de privación de alimento seguido por un incremento

lento, es el resultado de reacciones de estrés en el krill *Euphasia superba* (Mezykowski, Op.cit.). Respuestas al estrés de este tipo han sido bien estudiadas (Riegel, 1960, Munday y Thompson, 1962. En: Mezykowski, Op.cit.) y es claro que están reguladas hormonalmente. El incremento de glucosa en el hepatopáncreas puede ser interpretado como un resultado de la gluconeogénesis a partir de ácido láctico (Mezykowski, Op.cit.).

#### **B) Hormona hiperglicémica y su importancia.**

La hormona hiperglicémica (HHG) es un polipéptido cuyo peso molecular es de 7000 y se inactiva a 100°C. Abramovitz et al. (1944) reportaron por vez primera la respuesta hiperglicémica a una inyección de extracto crudo de pedúnculo ocular en crustáceos. Mediante la utilización de técnicas inmunocitoquímicas se han podido ubicar células productoras de HHG en el órgano X en *Carcinus* y en *Astacus* (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981). Se ha encontrado que la HHG tiene especificidad fisiológica por el tipo de respuestas fisiológicas que pueden estar relacionadas con la hiperglicemia, que se provoca al inyectar el extracto crudo de pedúnculo ocular y la hipoglicemia que muestran los animales en los que se ha llevado a cabo la ablación de los tallos oculares (Kleinholz, 1978).

La glucosa es el principal azúcar presente en la hemolinfa de los crustáceos; la hiperglicemia que se presenta después de la inyección de extracto de pedúnculo ocular es debida a la glucosa

(Hoonke y Scheer, 1970; Kleinholz y Little, 1949). El incremento del nivel de glucosa en hemolinfa en este caso puede resultar de la glucogenólisis, desde el momento en que hay decrementos significativos de glucógeno en los tejidos justo cuando la respuesta hiperglicémica está en su pico máximo (Keller y Andrew, 1973). Según Florkin (1960) la condición fisiológica del animal influye en los valores de glucosa en la hemolinfa. Al parecer, todos los tipos de hiperglicemia provocados por estrés en los crustáceos son iniciados por un principio diabetogénico liberado desde la glándula sinusal, que como se sabe es el locus de almacenamiento de los principios neurohumorales secretados en el órgano X. Esto es apoyado por la respuesta hiperglicemiante que presenta *Callinectes* a una inyección de extracto de pedúnculo ocular así como por la ausencia de efectos hiperglicémicos posteriores a la ablación del pedúnculo ocular durante situaciones de estrés como la asfixia (Florkin, *Op.cit.*). Dean y Vernberg (1965) reportaron variaciones en el nivel de glucosa en la hemolinfa de los crustáceos; estos autores compararon los niveles de glucosa en 5 estadios de desarrollo en *Callinectes*, en machos adultos, hembras juveniles y adultas, con huevecillos recién ovipositados y con huevecillos a punto de eclosionar: Sólo encontraron diferencias significativas (con niveles más bajos de glucosa) en hembras con huevecillos recién ovipositados. Sin embargo, hallaron una variación diurna en los niveles de glucosa en *Uca pugilator*, animales que presentaron un pico elevado por la tarde (17:30 h) y uno bajo por la mañana (5:30 h) aparentemente

independiente del fotoperiodo. En estos trabajos, los autores hacen énfasis en la influencia de la hora del día y en el estado reproductivo con respecto a la variación del nivel de glucosa en hemolinfa.

### 3.4 Anaerobiosis facultativa como un factor de adaptación;

Existen animales resistentes a la hipoxia con respuestas adaptativas de dos tipos; 1) estrategias metabólicas dirigidas a través de una "función oxidativa sostenida" es decir, que el organismo mantiene su consumo de  $O_2$  a pesar de la disminución en la cantidad de  $O_2$  presente en el medio. Esta respuesta se da en especies adaptadas a grandes altitudes. 2) Sin embargo, muchos invertebrados bajo estrés hipóxico dependen de estrategias metabólicas dirigidas hacia una función anaeróbica sostenida. A los organismos que han desarrollado tales mecanismos, efectivos contra la hipoxia, se les llama anaeróbicos facultativos (Hochachka, 1985, 1986). Este tipo de animales generalmente presentan 2 respuestas importantes para variar la obtención de  $O_2$ ; una de estas respuestas es la oxígeno-conformadora, es decir que la tasa de consumo de oxígeno baja conforme va bajando el  $O_2$  del medio. La otra es la respuesta mediante el paro del sistema de transferencia de electrones a nivel mitocondrial (*i.e.* cuando el decremento de  $O_2$  llega a un nivel crítico, el sistema se para abruptamente). La oxígeno-conformación se da de la siguiente manera; mediante la supresión metabólica a través de la limitación del oxígeno. En efecto, las células, tejidos u organismos cuya tasa de consumo de

$O_2$  ( $VO_2$ ) varía en rangos amplios con respecto al  $O_2$  presente en el medio se denominan oxígeno-conformadores; aquellos cuyo  $VO_2$  es independiente del  $O_2$  presente se denominan oxígeno-reguladores.

Se ha demostrado (Wiens y Armitage, 1961) que algunas especies de acociles son capaces de actuar como conformadores o reguladores parciales cuando se disminuye la disponibilidad de  $O_2$  en el medio, lo cual parece tener implicaciones adaptativas de acuerdo con los diferentes nichos ecológicos.

### 3.5 Hemolinfa:

#### A) Características:

La sangre de los invertebrados, en este caso del acocil, es llamada hemolinfa y se encuentra en un sistema circulatorio abierto, cuyos elementos figurados son los hemocitos (los cuales contienen hemocianina en vez de hemoglobina); la hemolinfa es un tejido cuyas características varían considerablemente durante el período de muda y al responder a cambios en el medio.

La composición iónica de la hemolinfa, Sensu Schlatter (1941), de *P. clarkii* es la siguiente:

#### Componentes orgánicos , Sensu Florin (1960) en *Astacus astacus*:

Glucosa: (varía según el grado de privación de alimento) de 10 a  
1.4 (mg/100ml)

Lípidos: 500-590 (mg/100ml)

Urea: 0.6 (mg/100ml)

Amonia: 2.2 (mg/100ml)  
Purinas: 1.2 (mg/100ml)  
Aminoácidos: 2.2 (mg/100ml)  
N<sub>2</sub> no protéico: 11 (mg/100ml)

Comp. inorgánicos:

Na: 82.4 (meq/l)  
K : 3 (meq) /l  
Ca: 12.6 (meq) /l  
Mg: 2.1 (meq) /l

Las concentraciones de ácido láctico en hemolinfa de *Astacus astacus* son de 0.74 + 0.004 g/l (Järvenpää, T. et al, 1983).

- Las principales funciones de la hemolinfa, son:

- 1) Transporte de nutrimentos del tracto digestivo a los tejidos
- 2) Transporte de metabolitos
- 3) Transporte de productos de desecho de los tejidos a los órganos excretores
- 4) Transporte de gases entre los órganos respiratorios y los tejidos
- 5) Transporte de hormonas
- 6) Transporte de células sin función respiratoria
- 7) Coagulación para protegerse de la pérdida de hemolinfa

El aparato circulatorio de los crustáceos decápodos consta de un corazón neurogénico dorsal rodeado de un seno pericárdico, cinco



arterias abandonan el corazón por la parte anterior, una por la parte posterior y otra por la parte inferior. La hemolinfa finalmente drena en un gran seno esternal medio antes de pasar por las branquias y regresar al corazón. Se ha calculado que el sistema circulatorio completo en los grandes decápodos es cubierto por la hemolinfa en 40 a 60 segundos. (En varios decápodos, el volumen total de hemolinfa representa del 20% al 40% del volumen total).

**b) Transporte de oxígeno:**

Es una de las características más importantes de la hemolinfa, ya que lleva el  $O_2$  a los tejidos del organismo que lo requieren para llevar a cabo sus funciones metabólicas. El oxígeno se comporta en el medio interno de acuerdo a las características físicas propias de los gases, entre las cuales la difusión es notable por su participación en el intercambio gaseoso. El acarreo del oxígeno a través del cuerpo es dependiente de la cantidad de hemocianina libre, así como de la manera en que varía la presión parcial de oxígeno en los diferentes tejidos en que se distribuye. Los pigmentos sanguíneos tienen funciones de amortiguación en el transporte de anhídrido carbónico. En los crustáceos el grupo de pigmentos que predomina es la hemocianina en dilución, la cual es el principal acarreador de oxígeno. A pesar de su nombre, ésta no contiene grupo hemo, ni hierro ni porfirina: A dos moléculas de cobre se une una molécula de  $O_2$ . Las hemocianinas son azuladas cuando están oxigenadas e incoloras sin oxígeno.

### c) Transporte de CO<sub>2</sub>:

El CO<sub>2</sub> es transportado por la hemolinfa hacia las estructuras respiratorias mediante pigmentos o disuelto, o bien en forma de carbonatos y bicarbonatos. Este gas tiene importancia no sólo como desecho del metabolismo en la hemolinfa sino también puede actuar como amortiguador, en el sistema bicarbonato/ácido carbónico HCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El bióxido de carbono difunde de los tejidos a la hemolinfa dependiendo del gradiente de presión y es transportado en el plasma en forma de anhídrido carbónico disuelto y en combinación química. Cuando el CO<sub>2</sub> es disuelto en H<sub>2</sub>O, se combinan y forman ácido carbónico:



El ácido carbónico, al igual que el ácido láctico, es amortiguado por las bases como el bicarbonato y en gran parte por las proteínas.

Las estructuras y la función del aparato respiratorio están íntimamente vinculadas al aparato circulatorio. El transporte de gas en crustáceos destaca por la utilización de hemocianina. El ácido láctico generado tanto por el músculo como por el hepatopáncreas puede presentarse en la hemolinfa para ser transportado a otro tejido.

### IV.- HIPOTESIS:

- Se ha demostrado que en crustáceos decápodos, situaciones de estrés como la fatiga, la hipoxia y la privación de alimento,

pueden producir un aumento en la concentración de lactato en hepatopáncreas y en músculo, con el consecuente aumento en la concentración de lactato en hemolinfa, (Boyland, 1928; Mezykowski, 1979).

- Si la duración y la intensidad del fotoperiodo constituye una situación de estrés para un decápodo nocturno como es el acocil, podríamos esperar que haya un aumento en la concentración de ácido láctico en la hemolinfa de estos invertebrados al colocarlos en condiciones extremas de luz.

- En ciertas situaciones de estrés relacionadas principalmente con condiciones de hipoxia, se ha observado una disminución de los movimientos ventilatorios del escafognatito con una disminución concomitante en el volumen respiratorio.

- Si el exceso de luz en el medio interfiere con los mecanismos de obtención de energía de sistemas aerobios podríamos esperar que, durante este posible estrés luminoso haya una disminución en el consumo de oxígeno de los organismos de estas dos especies, con el objeto de reducir el costo energético que constituyen los mecanismos ventilatorios.

#### V. OBJETIVOS:

- 1) Determinar si la condición de fotoperiodo extrema (L/O 20:4) provoca un cambio en la concentración de lactato en las especies *Procambarus clarkii* y *Procambarus digueti* y si hay diferencias interespecificas.
- 2) Determinar el consumo de oxígeno individual y relacionarlo con la concentración de lactato para estas dos especies.

#### VI. MATERIAL Y METODOS:

Se utilizaron dos grupos de acociles adultos (n=40) en período de intermuda, sin distinción de sexo, de talla y peso homogéneos (talla promedio : 11.5 cm y peso promedio: 18 g para la especie *clarkii* y talla promedio: 8.5 cm y peso promedio: 15 g para la especie *digueti*): 20 organismos de la especie *Procambarus clarkii* provenientes del estado de Chihuahua y 20 de la especie *Procambarus digueti* del estado de Michoacán. Los organismos en pequeños grupos se colocaron en acuarios bien aerados, provistos de filtro biológico y con lámparas de neón, totalmente aclimatados a las condiciones de laboratorio. Se establecieron 2 grupos de experimentación para cada una de las especies; 1 grupo control, el cual se sometió a una condición L/O 12:12 y un grupo experimental L/O 20:4. Todos los organismos fueron mantenidos en condiciones de temperatura (promedio de 22° C), aereación y alimentación constantes.

La intensidad de la luz blanca se fijó en 2092.3 luxes mediante un fotómetro radiómetro Li-cor modelo Li-189.

A la semana de haberlos mantenido bajo fotoperiodo, se procedió a extraer, de la patre ventral del 6to pleón, una muestra de aproximadamente 20 microlitros de hemolinfa por acocil con jeringas para insulina de 1 ml siempre a la misma hora del día (9hrs AM).

Después de haberse extraído la hemolinfa, los animales se reintegraron a las condiciones iniciales (L/O 12:12 o L/O 20:4) durante una semana más, al final de la cual se volvió a extraer la misma cantidad de hemolinfa. Para la extracción se anestesiaron los animales con frío, manteniéndolos de 20 a 40 minutos en el refrigerador y observando que el pedúnculo ocular se mantuviese inmóvil, evitando así estresarlos por manipulación. Se extrajo la hemolinfa pinchando transversalmente a los organismos a la altura del último pleón. La medición de concentración de lactato se determinó con una variante del método de Hohorst (1963).

#### Preparación de las soluciones:

Todas las soluciones se prepararon con agua doblemente destilada.

#### Sulfato de hidrazina:

Se pesó una cantidad de 5.2 g de sulfato de hidracina a la que se agregaron 0.2 g de EDTA y una pequeña cantidad de agua. Se midió el pH con un potenciómetro ajustado con el NaOH (10 N), hasta obtener un de 9.5. Se aforó a 100 ml con agua destilada. Se le agregaron 2 ml de EDTA. De esta manera la hidracina quedó a 0.8 M.

#### Glicina:

Se pesó una cantidad de 7.5 g de glicina y se le agregó una

pequeña cantidad de agua destilada. Se ajustó el pH de la misma manera que el anterior, aforando también con agua destilada a 100 ml. Se mezclaron las soluciones de glicina y de hidracina en proporción uno a uno. Se obtuvieron 450 microlitros para cada medición.

**NAD:**

Se disolvieron 40 mg de NAD con agua destilada y se aforó a 1 ml.

**Acido perclórico:**

Se diluyeron 10 ml de  $\text{HClO}_4$  con 100 ml de agua destilada.

**LDH:** Se disolvió el LDH a una proporción 1:10.

El método se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se disolvió la hemolinfa en agua destilada (1:1) y después en solución de ácido perclórico al 12% (1:2). Posteriormente se agitó y se centrifugó durante 1 min. a 1000 rev/min. en una microcentrifugadora Beckman mod. B. Del resultante se tomaron 10 microlitros del sobrenadante mediante una pipeta Gilson y se vertieron en cubetas de cuarzo para espectrofotómetro Zeiss PM2 AL. Por cada muestra se agregaron 450 microlitros de solución de glicina-hidracina, más 50 microlitros de solución de NAD y 490 microlitros de agua destilada. Se agitó bien la solución tapando la boca de la cubeta con parafilm.

Se calibró el espectrofotómetro a un rango de 0.250-0.890 nm. y a una longitud de onda de 0.340 nm (que es la  $\lambda$  reportada para el NAD). Quince minutos después, se colocó la cubeta en el espectrofotómetro para hacer la medición testigo. Posteriormente se

le agregaron 10 microlitros de la solución de LDH disuelta previamente en H<sub>2</sub>O (1:10), con la cual se provoca que la reacción  $\text{Lactato} + \text{NAD} \text{ ----> Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$  se desencadene, ya que la LDH cataliza la oxidación del L-lactato mediante el NAD. Se midió la absorbancia (densidad óptica) cada 10 minutos hasta que se estabilizaran los valores.

La concentración de ácido láctico se calculó utilizando la ecuación siguiente:

Delta de observación= medición estabilizada - medición testigo

$$\frac{\text{Delta de observación} \times 100 \times 4}{\text{---}}$$

0.00622

Con el objeto de verificar si existían diferencias significativas entre los animales control y experimentales para cada una de las especies se llevaron a cabo pruebas estadísticas, mediante la determinación de una t de Student para varianzas homogéneas.

Respecto al consumo de O<sub>2</sub> individual, se obtuvieron medidas a dos horas diferentes del día con un oxímetro YSI 51B; los organismos fueron colocados (en condiciones constantes de luz y temperatura; 22°C) en cámaras individuales repletas de agua (previamente hervida durante 30 minutos y enfriada posteriormente) provistas de una plataforma que separaba a los individuos del fondo, donde estaba

el agitador magnético sobre el cual se dejaron homogeneizar las cámaras durante 2 horas. Se midió el  $O_2$  disuelto en el medio de la cámara testigo (sin organismo); a esta medición se le restaron las mediciones de cada acocil para calcular el consumo individual. Los resultados se calcularon en  $\mu M/l$ . Los datos se graficaron después de haberlos sometido a las pruebas estadísticas correspondientes (t de Student para varianzas homogéneas).



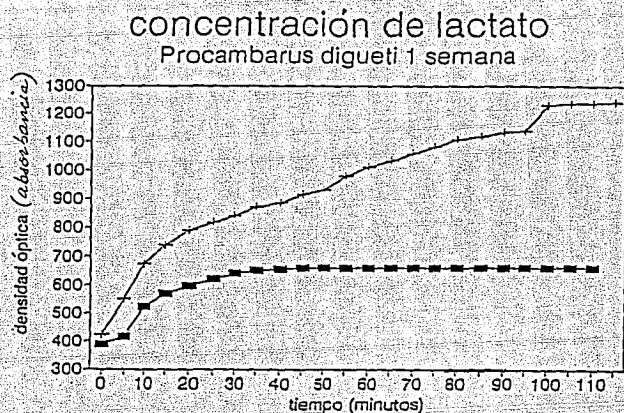
## VII. RESULTADOS:

Con el objeto de presentar como se llevó a cabo la metodología de determinación de ácido láctico, se muestra la figura 4:

Las gráficas A y B muestran la concentración de ácido láctico (representada por la densidad óptica del NADH a través de los diferentes tiempos en los que se realizaron las determinaciones) de organismos sometidos a una semana de fotoperiodo para las especies *clarkii* y *digueti*. La línea marcada con + representa en ambas gráficas a los datos obtenidos (en la determinación de lactato mediante una variante del método de Hohorst) con los lotes experimentales sometidos durante una semana a fotoperiodo 20:4. La línea marcada con ■ representa en las dos gráficas a los datos de los lotes control sometidos 1 semana a fotoperiodo 12:12. La altura de las barras representa la media de 10 organismos mas el error estándar.

Los valores del lote control (n=10) L/O 12:12, son mucho menores que los obtenidos en el lote experimental (n=10). Estos se estabilizan en 0.659 nm, en tanto que el valor máximo del lote experimental (L/O 20:4) alcanza los 1.24 nm. La t de Student fué significativa al 95%, i.e. con una  $p < 0.05$ , por lo que se considera que existe una gran diferencia entre la concentración de lactato en animales *P.digueti* control y experimentales con una semana bajo fotoperiodo. (Fig. 4 A)

A.



B.

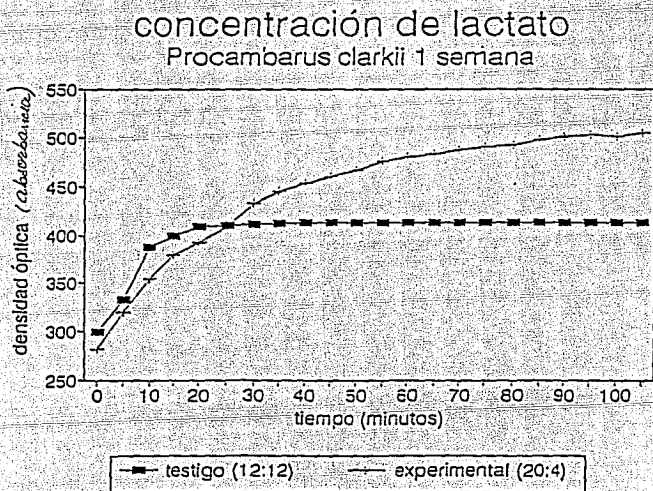


Fig. 4

Las gráficas A y B representan la concentración de lactato (representada por la densidad óptica del NADH a través de los diferentes tiempos en los que se hizo la determinación). En ambas gráficas se presentan las medias aritméticas de la concentración obtenidas para los diferentes tiempos en los 10 animales control y en los 10 animales experimentales. Se puede observar que los valores en la conc. de lactato en *P. digueti* experimentales son muy elevados. La *t* de Student calculada fue significativa al 5% ( $p < 0.05$ ).

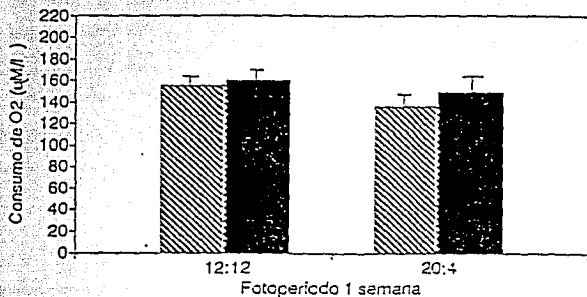
Los valores del lote experimental L/O (20:4) de la especie *clarkii*, llegan a ser mayores que los del lote control L/O (12:12) a una semana de exposición. (Fig 4 B)

Existen diferencias significativas entre el consumo de oxígeno que existe después de una semana y 2 semanas de exposición a la luz tanto en fotoperiodo control como experimental en el acocil *Procambarus digueti* tomados a dos horas del día (9 y 21 horas). Hay una reducción marcada ( $P < 0.05$ ) en el consumo de  $O_2$  a las dos semanas de exposición, tanto para el fotoperiodo 12:12 como para el fotoperiodo 20:4 (fig. 5, A y B). Así mismo se pueden obtener diferencias en el consumo de  $O_2$  de acuerdo con la hora del día. Después de una semana de exposición en el fotoperiodo 12:12, se observa un ligero incremento en el consumo a las 21 horas aunque no tiene significación estadística. Este incremento se hace más notorio en el régimen L/O 20:4 (fig. 5 A). Sin embargo, después de la exposición a dos semanas a un fotoperiodo corto (12 horas de luz), el consumo de  $O_2$  es mayor a las 9 horas aunque en el régimen experimental la diferencia noche-día continua, siendo mayor el consumo a las 21 horas (fig. 5 B). Lo anterior podría indicar un ritmo en el consumo de oxígeno, ya reportado para otras especies de crustáceos.

En la especie *Procambarus clarkii* los resultados muestran características diferentes. El consumo es menor después de una semana de experimentación que a las dos semanas (fig. 6, A y B). Así mismo, parece existir un aumento en el consumo de  $O_2$  en el

A.

## Consumo de O<sub>2</sub> Procambarus digueti



B.

## Consumo de O<sub>2</sub> Procambarus digueti

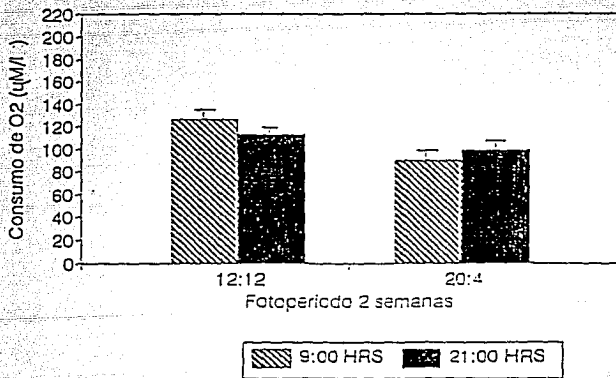


Fig 5: Las gráficas A y B representan las diferencias en el consumo de oxígeno (expresado en  $\mu\text{M}/\text{l}$ ) de *P. digueti* a dos diferentes horas del día entre los organismos de grupos testigo (L/O 12:12) y experimental (L/O 20:4) a 1 semana y a 2 semanas de exposición al fotoperiodo correspondiente. La altura de las barras corresponde a la media de 10 organismos más el error estándar. La *t* de Student calculada fue significativa al 5% entre los consumos de los lotes testigo a 1 y 2 semanas, así como entre los exp. a 1 y 2 semanas.

fotoperiodo 20:4 después de una semana de exposición; ésto es claro en el caso de las determinaciones de las 9 de la mañana pero no en el de las 21 horas; da la impresión que en esta especie, en el caso de existir un ritmo de ingesta de  $O_2$ , éste se invierte en la condición de fotoperiodo largo (fig. 6 A).

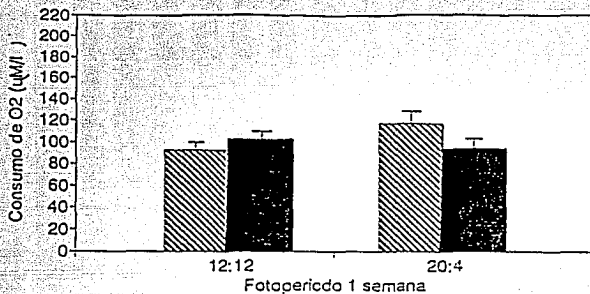
La exposición del animal a dos semanas de luz indica un aumento pronunciado en el consumo de  $O_2$  en las dos condiciones, aunque es mucho más significativo en el régimen L/O 12:12, sin embargo existen diferencias significativas estadísticamente tanto entre los grupos expuestos a 1 y a 2 semanas como entre los grupos de fotoperiodo corto y largo expuestos a 2 semanas. La posible inversión del ritmo se hace muy evidente en el fotoperiodo 20:4.

Se pueden observar los cambios en la concentración de lactato en hemolinfa entre la 1ª y 2ª semanas de exposición a diferentes fotoperiodos (fig. 7A). En el control (12:12), el cambio no es muy notorio, sin embargo en la condición experimental (20:4) la producción es altísima ( $55 \mu\text{M}/\text{ml}$ ) a la primera semana de exposición y disminuye mucho a las dos semanas, inclusive por debajo de los valores control. Hay que hacer notar que la mortalidad de estos organismos fué muy alta en esta situación de fotoperiodo extremo teniendo que sustituir constantemente los bloques de experimentación (95% de mortalidad).

La especie *Procambarus clarkii* muestra resultados muy diferentes (fig. 7 B): La concentración de lactato aumenta desde la

A.

### Consumo de O<sub>2</sub> Procambarus clarkii



B.

### Consumo de O<sub>2</sub> Procambarus clarkii

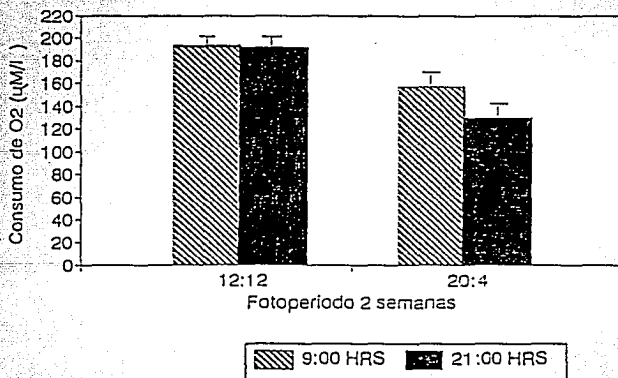
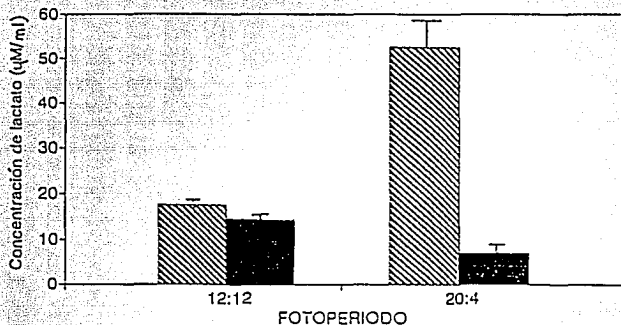


Fig. 6: En esta figura, las gráficas A y B muestran las diferencias en el consumo de oxígeno (expresados en  $\mu\text{M/l}$ ) a dos horas diferentes del día (9 A.M. y 9 P.M.), entre los lotes testigo y experimental, a 1 semana y a 2 semanas de fotoperíodo. Las barras representan la media de 10 organismos más el error estándar. (Ver explicación en el texto)

A.

P. DIGUETI  
COMPARACION LAC. A 1 Y 2 SEM.



B.

P. clarkii  
COMPARACION LAC. A 1 Y 2 SEM.

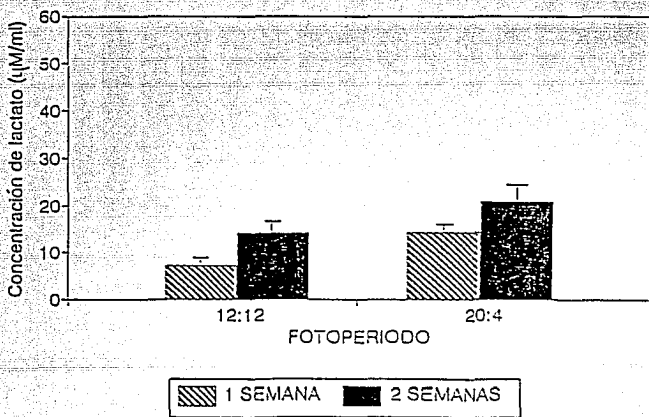


Fig. 7: Esta figura muestra las comparaciones de las concentraciones de lactato tomadas a las 9 A.M. a 1 y 2 semanas de fotoperiodo, entre los lotes testigo y experimental para ambas especies. La altura de las barras representa la media de 10 organismos mas el error estándar. (Nótese la gran diferencia entre el lote testigo y el lote experimental a la 1<sup>a</sup> semana de fotoperiodo de *P. digueti* y la clara diferencia entre la 1<sup>a</sup> y la 2<sup>a</sup> semana en *P. clarkii* así como el aumento en la concentración en la condición 20:4)

primera a la segunda semana tanto en el control como en la condición experimental. Sin embargo también existen diferencias estadísticamente significativas entre la situación 12:12 y la situación 20:4, tanto a la primera como a la segunda semana.

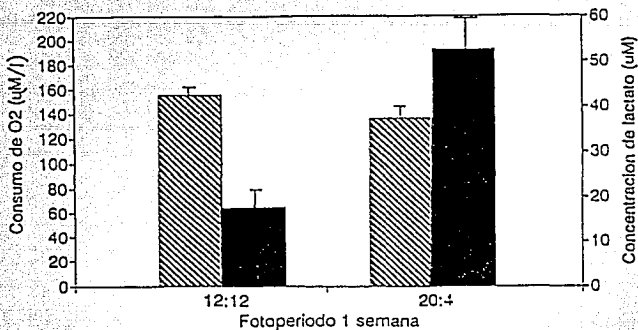
La fig. 8 trata de resumir la relación entre la producción de ácido láctico y el consumo de  $O_2$  en la especie *Procambarus digueti* se puede observar una relación inversamente proporcional entre la producción de lactato y el consumo de oxígeno, el cual disminuye al aumentar la concentración del ácido láctico en la hemolinfa. Esto es muy claro a 1 semana de exposición al fotoperiodo largo. Después de 2 semanas, la producción de lactato así como el consumo de oxígeno disminuyen en esta condición experimental.

La fig. 9A resume los mismos resultados para *P. clarkii* después de una semana de exposición. En la condición experimental, se puede observar cómo aumentan tanto el consumo de  $O_2$  como la producción de ácido láctico (como si los requerimientos energéticos del animal aumentaran y se utilizaran las 2 vías). Sin embargo, a las 2 semanas de exposición la relación lactato-oxígeno se hace inversamente proporcional, al aumentar la producción de lactato en la condición L/O 20:4 disminuye el consumo de  $O_2$  (lo anterior puede indicar un aumento en las vías anaeróbicas en relación con las aeróbicas): No obstante, en esta especie el cambio no es tan dramático como en la especie *P. digueti* en donde, a la primera semana la relación inversamente proporcional es notable.



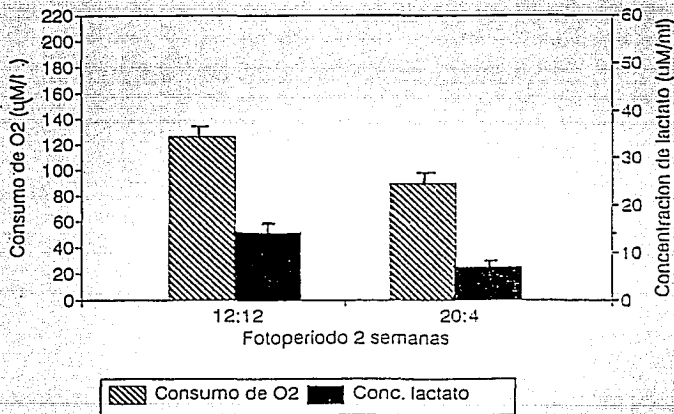
### Relación Lactato-O<sub>2</sub> Procambarus digueti

A.



### Relación Lactato-O<sub>2</sub> Procambarus digueti

B.





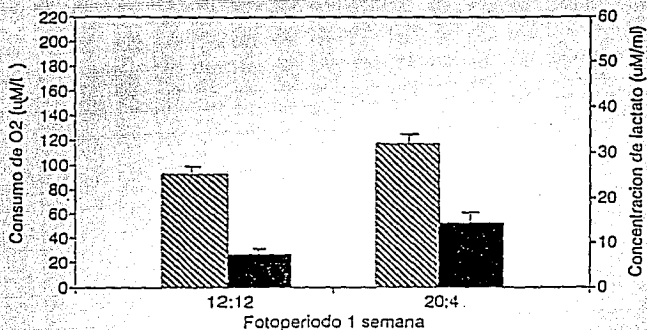
 Consumo de O<sub>2</sub>
 Conc. lactato

Fig. 8: Tanto las gráficas A como B muestran la relación entre la concentración de ácido láctico (expresado en µM/ml) en los grupos control y experimental diurnos (9 A.M.) para cada especie. La altura de las barras representa la media de 10 organismos más el error estándar. (Ver explicación en el texto)

A.

### Relación Lactato-O<sub>2</sub> Procambarus clarkii



B.

### Relación Lactato-O<sub>2</sub> Procambarus clarkii

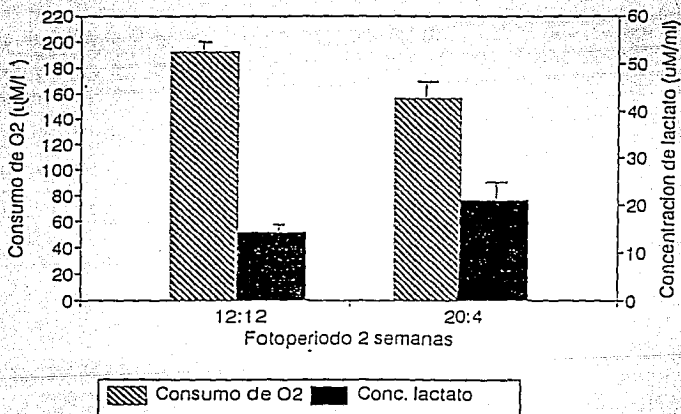


Fig. 9: Al igual que la fig. 8, esta figura muestra la relación entre la concentración de lactato y el consumo de oxígeno matutinos entre los grupos control y testigo en ambas especies, a diferencia del periodo de exposición al fotoperiodo, que en este caso, es de dos semanas. (ver explicación en el texto)

### VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES:

Los resultados parecen indicar que el aumento en la duración de la luz de alta intensidad aplicada a las especies *digueti* y *clarkii* produce efectos metabólicos similares a otros factores considerados como de estrés, por ejemplo: El ejercicio, la falta de alimento, el aumento en la temperatura, la disminución en la  $PO_2$ , etcétera. Wood y Rendall (1981) reportaron acidosis metabólica post-ejercicio en *Cardisoma carnifex*. Esta acidosis es debida fundamentalmente a un aumento de lactato en hemolinfa. Mc Donald et al. (1979) reportaron lo mismo en *Cancer magister*. Así mismo, se ha reportado el aumento de lactato en hemolinfa en la langosta y el yabbie relacionado con la concentración de este ácido en el músculo y en el hepatopáncreas (Phillips et al., 1976). En el krill *Euphasia superba*, Mezykovski (1979) reportó un aumento notable en la concentración de ácido láctico en hemolinfa (0.648 mg/ml HL) después de someterlo a un estrés de deprivación alimenticia, el cual estaba relacionado también con una disminución del lactato en el hepatopáncreas. Truchot (1980) reportó un aumento en la concentración de lactato en la hemolinfa de *Carcinus maenas* al ser sometido a un severo estrés hipóxico. Este autor considera la posibilidad de que el aumento de L-lactato en la hemolinfa de estos crustáceos juegue un papel adaptativo en la curva de disociación de  $O_2$  cambiándola hacia la izquierda y por lo tanto aumentando la afinidad de la hemocianina al oxígeno a valores muy bajos de  $PO_2$ .

Sinha y Dejours (1980) han reportado acidosis metabólica en el

acocil *Astacus leptodactylus* debido al estrés inducido por hipoxia, la cual deprime la ventilación y a un estrés térmico.

Por otra parte está bien estudiado que la tasa metabólica de los crustáceos puede variar a través del día; en general en diversos géneros de acocil se han reportado cambios rítmicos de 24 horas en el consumo de  $O_2$  (Rice y Armitage, 1974). Estas variaciones cíclicas del metabolismo parecen estar relacionadas con los cambios cíclicos locomotores que presentan este tipo de animales, pues los picos en el consumo de  $O_2$  se han reportado en los periodos de mayor actividad del animal (Fingermann, 1955). Varios estudios han demostrado la existencia de cambios cíclicos estacionales en el metabolismo de los crustáceos (Lockwood, 1967), los cuales muy probablemente podrían ser debidos a variaciones en la longitud del día. Estos cambios metabólicos desde luego parecen estar asociados a los ciclos anuales de muda y reproducción. Debido a todo lo anterior, en este trabajo se utilizaron individuos que se encontraban en un periodo de intermuda y en una fase no reproductora. El ciclo anual de muda, el cual está asociado con la actividad reproductora en las dos especies estudiadas, parece tener dos picos (Sukô, 1958); uno en primavera y otro en otoño en el caso de *P. clarkii* y únicamente en primavera en el caso de *P. digueti*.

Debido a las posibles variaciones diurnas en el consumo de  $O_2$  que podrían estar relacionadas con un ciclo diario en la producción de

lactato se hicieron determinaciones en el consumo de  $O_2$  dos veces al día y siempre a la misma hora para un mismo grupo de animales. Fué imposible hacer dos determinaciones similares para la concentración de lactato debido al estrés que provocaría en los animales experimentales la toma de hemolinfa dos veces al día. Los resultados de este trabajo parecen indicar, a pesar de que hay dos mediciones únicamente a través del nictámero, un posible ritmo en el consumo de  $O_2$  que es más evidente en *P. clarkii* que en *P. digueti*; sin embargo, en *P. digueti* este ritmo no cambia de fase cuando el animal se somete a la condición extrema de luz (L/O 20:4); el pico máximo continua siempre a las 21 horas. Por lo anterior, aunque en estos animales existiera también un ritmo diario en la concentración de ácido láctico con un pico máximo nocturno como se ha reportado para otros crustáceos (Mezykovski, 1979), la duración del fotoperiodo no alteraría la acrofase del ritmo. Por lo que se puede considerar que el aumento de lactato que se encontró en la condición de máxima luminosidad no es debida a una inversión de fase en este posible ritmo producido por la duración del fotoperiodo, sino parece ser un efecto del estrés producido por la condición de alta luminosidad. En *P. clarkii* sin embargo, sí hay cambio de fase en el consumo de oxígeno en la condición 20:4, por lo que el aumento de lactato en esta misma condición podría indicar una inversión en la fase del posible ritmo.

Son notables las diferencias encontradas en ambas especies, desde una semana a dos semanas de exposición a la luz. Estas diferencias parecen ser debidas a las características

ecológicas de ambas especies. *Procambarus clarkii* es una especie introducida en México procedente de países que se encuentran a altas latitudes a pesar que ha demostrado poderse adaptar a regiones del norte de nuestro país. Este animal se caracteriza por invadir tanto medios aerobios como anaerobios (Holdich, 1988); vive tanto en los canales de irrigación y aguas estancadas como en madrigueras y túneles que construye a algunos centímetros de profundidad, por lo tanto se le puede considerar una especie subtidal. *Procambarus digueti*, por el contrario, vive en regiones ecuatoriales y tropicales como son los Estados de Michoacán y Jalisco. Es una especie que habita aguas someras y bien oxigenadas; y además de ser una especie endémica, se ha considerado en algunas ocasiones como una posible especie en extinción (Villalobos-Hiriart, N. com. pers.).

En numerosos trabajos se han encontrado correlaciones entre el consumo de oxígeno y el nicho ecológico en crustáceos de agua dulce. Tanto isópodos como acociles que viven en aguas en donde existe un flujo continuo, generalmente presentan tasas metabólicas más altas que los organismos que habitan aguas estancadas y los acociles cavernícolas presentan tasas de consumo de oxígeno más bajas que los acociles que habitan en zonas superficiales (Dickson y Franz, 1979).

Por otra parte, se ha reportado que las especies procedentes de latitudes extremas poseen generalmente tasas metabólicas más altas que las de latitudes menores que se encontraban a la misma

temperatura (Vernberg, 1983). Sin embargo, se han observado excepciones a estas generalizaciones; Epp y Lewis (1979) encontraron que *Mesocyclops brasiliensis* de Venezuela posee una tasa metabólica superior a la de especies similares de aguas templadas.

Los resultados no nos permiten hablar de tasa metabólica pues únicamente se tomó el consumo de oxígeno del medio. Es válido tomar la tasa metabólica estándar como parámetro en un animal ectotermo colocado a una temperatura constante como fué el caso de estos experimentos. Otros resultados de nuestro laboratorio reportan tasas metabólicas estándar mayores en el acocíl *P. digueti* debido a que es una especie de menor tamaño que *P. clarkii*.

Diversos autores han reportado resultados contradictorios sobre el efecto de la duración del fotoperiodo en el consumo de oxígeno en los crustáceos. Dehnel (1958) encontró un aumento en el consumo de  $O_2$  en dos especies de cangrejos intertidales mantenidos en condiciones de salinidad y temperatura constantes pero sometidos a fotoperiodos cortos (8 horas de luz). Sin embargo, Rice y Armitage (1974) no encontraron efectos directos en el metabolismo de *Orconectes nais* sometidos a fotoperiodos de diferente duración, aunque en sus experimentos la mayor duración de fotoperiodo fué de 14 horas (menor cantidad de luz que en nuestros experimentos). Nuestros resultados sí indican diferencias en el consumo de oxígeno de *P. clarkii*; de  $100 \mu M/l$  después de una semana en el grupo control

a 120  $\mu\text{M}/\text{l}$  en el grupo experimental sometidos a una semana de luz, aunque este aumento va acompañado de un incremento en la producción de ácido láctico de 5 a 15  $\mu\text{M}/\text{ml}$  (fig. 9 A). No obstante, después de dos semanas de exposición a la luz, esta especie aumenta mucho su consumo de oxígeno en la condición control (12:12) que ha acrecentado la concentración de lactato a valores similares a los que se encuentran en una semana en la condición 20:4. Pero al comparar la condición control con la condición 20:4, la concentración de lactato continúa aumentando (20  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) en tanto que el consumo de  $\text{O}_2$  disminuye (fig. 9 B).

El comportamiento de la especie *P. digueti* es muy diferente con solo una semana de exposición a la luz, el grupo de animales utilizados muestra una relación inversa entre el grupo control y el experimental (fig. 8 A).

En el régimen L/O 20:4 el consumo de oxígeno disminuye de 160 a 140  $\mu\text{M}/\text{l}$  y la concentración de lactato sube de 17 a 50  $\mu\text{M}/\text{ml}$ . La supervivencia de esta especie a un régimen L/O 20:4 de una duración de dos semanas fue muy pobre teniendo que sustituir los animales experimentales debido a la alta mortalidad. En la fig. 8 B se puede observar la disminución en el consumo de  $\text{O}_2$  que ya es conspicua en el grupo control y la notable disminución tanto del consumo de oxígeno como de la producción de ácido láctico en el grupo experimental, lo que podría indicar una inhibición tanto de las vías aerobias como de las vías anaerobias de obtención de energía.



A pesar de que en ambas condiciones, la control y la experimental y para ambas especies, las condiciones de aereación fueron constantes y la tensión parcial de oxígeno no decayó en ningún momento, los cambios en el consumo de oxígeno y el aumento en la producción de lactato, en *P.digueti* a una semana de exposición y en *P.clarkii* a dos semanas de exposición, parecen indicar un cambio (shift) de vías aerobias a vías anaerobias.

Este cambio aparente en la utilización de vías metabólicas es interesante y aunque es difícil de explicar, se podría pensar que quizá el efecto de duración de la alta luminosidad en el medio podría inhibir alguno de los procesos involucrados en las vías de respiración aerobia (ya sea debido a una inhibición en la ventilación que lleva a la entrada de oxígeno al organismo o bien a procesos fotodinámicos a nivel celular) como ha propuesto Ninneman (1970), ya sea a una fotodestrucción de la cadena de citocromos o bien a una inhibición de algún proceso del ciclo de Krebs en el animal (Matile y Frey-Wyssling, 1962).

A pesar de que estamos conscientes que esta proposición es altamente elocubrativa, en el caso de animales integros, ésto podría explicar la relación inversamente proporcional entre el consumo de  $O_2$  y la producción de lactato que se presenta particularmente en la primera semana de exposición a la luz en *P.digueti*, especie en la cual no parece sostenerse esta posibilidad de anaerobiosis y el efecto de la luz llega a ser mortal.

La especie *P.clarkii* en cambio parece presentar una posibilidad de adaptación a este cambio climático extremo, mostrando un aumento sostenido en la producción de ácido láctico con una disminución moderada en el consumo de  $O_2$ . Truchot y Lallier (1992) han propuesto al L-lactato, el principal y prácticamente el único producto del metabolismo anaeróbico en los crustáceos decápodos, como un cofactor fisiológico que aumenta la afinidad de la hemocianina por el  $O_2$ . Así, al aumentar esta afinidad, puede actuar como un modulador (de acuerdo con su concentración en hemolinfa y con las condiciones fisiológicas y/o ambientales a los que se ve expuesto el animal) del requerimiento específico de  $O_2$ .

No se puede olvidar que, al exponer un organismo a un fotoperiodo estresante (en este caso un organismo nocturno bajo condiciones de 20 h luz y 4 h obscuridad), la incidencia de luz va a actuar sobre los órganos neuroendocrinos reguladores que se encuentran en el tallo ocular, es decir el órgano X y la glándula sinusal, donde a su vez se encuentran tanto la hormona de adaptación a la luz, como la hormona inhibidora de la muda y la hyperglucemiante. El sistema neuroendocrino del acocil debe ser capaz de responder mediante diferentes adaptaciones metabólicas a condiciones desfavorables, la modulación de vías metabólicas podría ser una de estas adaptaciones.

Todo lo anterior parece indicar:

1) que la luz, en condiciones de alta luminosidad y duración, es un factor de estrés para los acociles *P. clarkii* y *P. digueti*.

2) que existen diferencias adaptativas importantes entre las dos especies, quizá debidas a las características de su sistema neuroendocrino las cuales se reflejan en respuestas metabólicas y resistencias diferentes.

3) que la especie *Procambarus clarkii* parece comportarse como un anaeróbico facultativo en condiciones extremas, lo que le permite adaptarse e invadir diferentes nichos ecológicos.

## IX. LITERATURA CONSULTADA

- Abramovitz, A. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. Biol. Bull. 86:1-5
- Barnes, R.D. (1972). Zoología de los invertebrados Ed. Interamericana, México. 1157 pp.
- Boyland, E. (1928) Chemical changes in muscle II. Invertebrate muscle. Biochem. J. 22: 362-376
- Dean & Vernberg (1965). Variations in the blood glucose level of crustacea. Comp. Biochem. Physiol. 14b:699-708
- Dedinger, J.E. & F.C. Schlatzlein (1973). Carbohydrate metabolism in the striped shore crab, Pachigrapsus crassipes- II. Glycolytic rates of muscle, gill and hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol. 46 B:699-708
- Dehnel, P.A. (1958). Effect of photoperiod on the oxygen consumption of two species of intertidal crabs. Nature (181) 4620:1415-1417
- Drach, P. (1939). Mue et cycle de l'intermue chez les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Océanogr. Paris [N.S.] 19:103-391
- Eagan, C.J. (1963) Local vascular adaptations to cold in man. Fed. Proc. 22:947-951
- Eckert, R. D. Randall, G. Augustine.(1990) Fisiología Animal. Mecanismos y adaptaciones. Ed. Interamericana, McGraw - Hill. 3a Edición, 683 pp.

- Epp, R.W. & W.M. Lewis (1979). Metabolic responses to temperature change in a tropical freshwater copepod (Mesocyclops brasilianus) and their adaptive significance. *Oecologia* 42:123-189
- Fingermann, M. (1955) Factors influencing the rate of oxygen consumption of the dwarf crayfish Cambarellus shufeldtii. *Tulane Stud. Zool.* 3:103-116
- Folk, E. (1974). Textbook of environmental physiology. 2a ed. (Lea & Febiger eds.) Philadelphia, E.U.A. 465 pp.
- Forward, R.B. & J.D. Costlow (1974). The ontogeny of phototaxis by larvae of the crab Rhithropanopeus harrisi. *Mar. Biol.* (Berlin) 26:27-33
- Forward, R.B. & T.W. Cronin (1978). Crustacean larval phototaxis: Possible functional significance. En: Physiology and behavior of marine organisms D.S. McLusky & A.J. Berry Eds. Pergamonn Oxford:253-261
- Fry, F.E. (1947). Effects of the environment on animal activity. *Univ. Toronto Stud. Biol. Ser. No. 55: Publ. Ontario Fish. Res. Lab., No. 68:1-62*
- Florkin (1960) En: Watermann (1960). The physiology of Crustacea Academic Press N.Y.; Vol 1, Cap. 4 :141-155.
- Georgels-Kallen & Van Herp (1981). Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the X-organ sinus gland complex in the eyestalk of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordmann, 1842). *J. Morphol.* 170:347-355
- Hoar, W.S. (1973). General & comparative Physiology. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey Ed. E.U.A. 851 pp.

- Hochachka, P.W. & M. Guppy (1987). Metabolic arrest and the control of biological time. Harvard college. Cap. 2:11-35
- Hochachka, P.W. (1986). Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 231:234-241 .
- Hohorst, H.J. (1963). L-(+) Lactate: Determination with Lactic Dehydrogenase and DPN. En: Methods in enzymatic analysis. Academic Press, N.Y.:266-270 (1963).
- Holdich, D. (1988). Freshwater crayfish, biology, management and exploitation Holdich & Lowery Ed. 498 pp.
- Honke, L. & B.T. Scheer (1970). Carbohydrate metabolism in Crustaceans En: Bliss, D. (1985) The biology of crustacea Vol.9 Academic Press Inc. N.Y. 550 pp.
- Järvänpää, T. (1983). Effects of hypoxia on the haemolymph of the freshwater crayfish Astacus astacus L., in neutral and acid water during the intermoult period Freshwater crayfish V. The AVI publishing Company, Inc. Westport Connecticut. Sec. II:86-97
- Keller & Andrew (1973). The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone Gen. Comp. Endocrinol. 20:572-578
- Kleinholz & Little (1949). Studies in the regulation of blood-sugar concentrations in crustaceans. I. Normal values and experimental hyperglycemia in Libinia emarginata Biol. Bull. (Woods Hole Mass.) 96:218-227
- Linné, C. (1748). Tal om märkvärdigheter uti insekternas... Ed. contemp. (1964). Fyra Skrifter Lindfors Bokförlag, 160 pp.
- Lehninger, A. (1982). Principles of Biochemistry Worth Publishers Inc. N.Y. 1011pp.

- Lockwood, A. (1967). Aspects of the physiology of crustacea (Freeman ed.) San Francisco, E.U.A.
- Matile & Frey-Wyssling (1962) En: Ninnemann, H. (1970):499
- Mc Donald, D.G., B.R. Mc Mahon & C.M. Wood (1979). An analysis of acid-base disturbances in the haemolymph following strenuous activity in the dungeness crab Cancer magister. J. Exp. Biol. 79:47-58
- McWinnie & Kirshenberg (1962). Crayfish hepatopancreas metabolism and the intermolt cycle. Comp. Biochem. Physiol. 6:117-128
- Meyerhof & Lohman (1927). En: Boyland (1928):362
- Mezykowski, T. (1979). Diurnal rhythms in metabolism of carbohydrate substrates in the antarctic krill Euphasia superba dana. Ekologia Polska (27) 3 :497-519
- Ninnemann, H. et al. (1970). Inhibition of respiration in yeast by light. Biochem. Biophys. Acta:499-506
- Page, T.L. & J.L. Larimer (1975) Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I The locomotor activity rithm. J. Comp. Physiol. 97:59-80
- Phillips, J.W. (1977). Lactic acid formation in crustaceans and the liver function of the midgut gland questioned. Comp. Biochem. Physiol. 56B:427-433
- Pittendrigh, C. S. C. (1981). Spring Harbor. Simposia on Quantitative Biol. 25:159-182
- Frosser, C.L. (1955). Physiological variation in animals. Biol. Rev. 30:229-262 .

rosser, C.L. (1973). Comparative animal physiology Department of  
physiol. and Biophysics. University of Illinois at Urbana-Champaign  
:8

Rice & Armitage (1974). The effect of photoperiod on O<sub>2</sub> consumption  
of Orconectes nais. Comp. Biochem. Physiol. 47A :261-270.

Riegel, J.A. (1960). Blood glucose in crayfish in relation to moult  
and handling. Nature, Lond. 186:727-728

Rounds, D.E. & R.S. Olsson (1967). The effect of intense visible  
light on cellular respiration. Life Sci. (6):359.

Sastry, A.N. (1983). Ecological aspects of reproduction. En: The  
biology of crustacea: Environmental adaptations (8), F.Vernberg &  
W.B. Wernberg eds. Academic Press, N.Y.

Sinha, N.P. & P. Dejours (1980). Ventilation and blood acid-base  
balance of the crayfish as functions of water oxygenation (40-1500  
Torr). Comp. Biochem. Physiol. 65A:427-432

Schlatter, M.J. (1941). Analysis of the blood serum of Cambarus  
clarkii, Pachigrapsus crassipes and Panulirus interruptus.

J. Cellular Comp. Physiol. 17:259-261

Schmidt-Nielsen, K. (1968). En:Bliss (1985). The biology of  
crustacea. Academic Press N.Y.

Sulkin, S.D. (1973). Depth regulation of crab larvae in the  
absence of light. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 13:73-82

Sulkin, S.D. (1975). Influence of light in the depth regulation of  
crab larvae. Biol. Bull. (Woos Hole, Mass.) 148:333-343

Sukô, T. (1958). Studies on the development of the crayfish. VI.  
The reproductive cycle. Sci. Rep. Saitama Univ. (Japón), 3B:79-91



Thompson (1962). (En: Mezykovski, 1979)

Truchot, J.P. (1980). Lactate increases the  $O_2$  affinity of crab hemocyanin. J. Exp. Zool. 214:205-208

Truchot & Lallier (1992). Modulation of the  $O_2$ -carrying function of hemocyanin in crustaceans. Union Physiol. Sci/Am Physiol Soc. (7):49-52

Vernberg, F.J. (1962). Comparative physiology; latitudinal effects on physiological properties. Ann. Rev. Physiol. 24:517-546

Wiens, A. & K.B. Armitage (1961) Physiol. Zool. 34:39-54 .

Wood & Rendal (1981). Haemolymph gas transport, acid-base regulation and anaerobic metabolism during exercise in the land crab (Cardisoma carnifex). J. Exp. Zool. 218:23-35