



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



U N A M

**EFFECTO DEL CADMIO EN LA OSMOREGULACIÓN DE JUVENILES
DE *Litopenaeus setiferus* (CRUSTACEA: DECAPODA)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA MARINA)

PRESENTA

SEBASTIAN RICARDO ZUÑIGA LAGUNES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. RUTH CECILA VANEGAS PÉREZ

COMITÉ TUTORAL: DRA. IRMA ROSAS PÉREZ

DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ

MÉXICO D. F., 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo a mis hijos:

Luis Eduardo, Arturo Sebastián e Isaac por enseñarme lo que es ser padre y darme la más grande de las alegrías que te pueda dar la vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Cecilia Vanegas por su excelente dirección para la realización de este trabajo y su gran paciencia para sus enseñanzas.

A la Dra. Irma Rosas Pérez por sus valiosas contribuciones y por formar parte del jurado.

Al Dr. Antonio Peña Díaz por sus valiosas contribuciones y formar parte del jurado.

Al Dr. Rene Cárdenas por su asesoría, apoyo y valiosos consejos para la determinación de la actividad enzimática y la realización de este trabajo y formar parte del jurado.

Al Dr. Carlos Rosas por sus valiosas contribuciones y formar parte del jurado, y especialmente por su apoyo en Cd. del Carmen para la captura y mantenimiento de los organismos.

A la Dra. Ma. Esther de la Rosa Duque por su apoyo y consejos valiosos para la digestión y la determinación de metales de las muestras de tejidos.

A la M. en C. Guadalupe Barrera de la UAM Iztapalapa por su asesoría y enseñanza para la determinación de metalotioneínas.

Al M. V. Z. Mario Soriano Bautista por su apoyo y asesoría en el manejo de los ratones para el análisis de metalotioneínas.

Al Biol. David Montañó de PURINA S.A. de C.V. por el alimento proporcionado para el mantenimiento de los camarones.

A la M. en C. Araceli Tovar de la USAI de la Facultad de Química por su apoyo y enseñanza para la utilización y corrimiento de las muestras en el Espectro de Absorción Atómica.

A todo el personal de la estación Del Carmen en Cd. del Carmen, Campeche: Dr. Adolfo Cruz, Dra. Gabriela Gaxiola, Dra. Maite Mascaro y Lic. Nelda, por su apoyo para la captura y mantenimiento de los organismos en Cd. del Carmen.

A la Biol. Susana Alejandre, Biol. Rosa Núñez, M. en C. Cecilia Robles, Biol. Maribel, Biol. Catalina Maldonado, Dra. Guillermina Alcaraz, Dra. Sonia Espino, Dr. Xavier Chiapa por sus consejos y compañía en el laboratorio de Ecofisiología

Al CONACYT por la beca-credito otorgada para la realización de los estudios de posgrado y la realización este trabajo.

INDICE

I. LISTA DE ABREVIATURAS	I
II. RESUMEN	II
III. INDICE DE FIGURAS	IV
IV. INDICE DE TABLAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	7
1.2. Hipótesis	10
1.3. Objetivos	11
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Captura	12
2.2. Mantenimiento	12
2.3. Fase experimental	13
2.4. Respuestas evaluadas	
2.4.1. Osmoregulación	15
2.4.1.1. Presión osmótica	15
2.4.1.2. Iones plasmáticos	16
2.4.1.3. Proteína total	16
2.4.1.4. Actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa en branquia	16
2.4.1.5. Contenido de agua corporal	19
2.4.1.6. Consumo de oxígeno	20
2.5. Bioacumulación de cadmio	21
2.6. Concentración de metalotioneínas	22
2.7. Análisis estadístico	24
3. RESULTADOS	25
3.1. Osmoregulación	
3.1.1. Presión osmótica	26
3.1.2. Iones plasmáticos Na^+ , K^+ y Cl^-	28
3.1.3. Proteína total en hemolinfa	36
3.1.4. Actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa	38

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.5. Agua corporal	41
3.1.6. Consumo de oxígeno	43
3.2. Bioacumulación de cadmio	46
3.2.1. Acumulación en branquia	46
3.2.2. Acumulación en hepatopáncreas	49
3.3. Metalotioneínas	
3.3.1. Metalotioneínas en branquia	52
3.3.2. Metalotioneínas en Hepatopáncreas	54
4. DISCUSIÓN	58
5. CONCLUSIONES	75
6. RECOMENDACIONES	76
7. ANEXOS	77
8. BIBLIOGRAFÍA	85

I. LISTA DE ABREVIATURAS

pH.....	Potencial de hidrogeno.
ups.....	Unidades practicas de salinidad, por acuerdo internacional se sustituye ‰ (partes por mil) debido a que la salinidad es una medida adimensional; sin embargo, se respeta esta simbología manejada por los autores referidos.
mOsm.....	Mili osmoles
°C.....	Grados centígrados.
CL ₅₀	Concentración Letal que ocasiona el 50% de mortalidad.
PH.....	Peso Húmedo.
PS.....	Peso Seco.
l.....	Litros.
µl.....	Micro litros.
h.....	Hora.
%.....	Por ciento.
mM.....	Mili molar.
rpm.....	Revoluciones por minuto.
g.....	Gravedad.
EDTA.....	Etilendinitrilotetracetato disódico.
DTT.....	Ditiotreitól.
PMSF.....	Fenil-metil-sulfonil-floruro.
nm.....	Nanómetros.
vol.....	Volumen.
Pi.....	Fósforo inorgánico.
mA.....	Mili amperes.
MT.....	Metalotioneína.
QO ₂	Consumo de oxígeno peso específico.
OD.....	Oxígeno disuelto.
PO.....	Presión osmótica.
n.....	Número de datos.
R ²	Coefficiente de determinación.
ES.....	Error estándar
ND.....	No determinado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto tóxico del cadmio sobre la osmoregulación de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* y conocer el patrón de bioacumulación del cadmio y su relación con la síntesis de metalotioneínas. Los camarones se expusieron durante 5 días en 0.10 y 0.18 mgCd/l a 28°C; posteriormente se transfirieron a un medio libre del metal durante 7 días. Se consideraron dos salinidades experimentales: 17ups (condición de isosmoticidad) y 10ups (condición de hiperregulación). Las evaluaciones se efectuaron durante la exposición al cadmio (0, 24, 72 y 120 h) y durante la recuperación al metal (24, 72 y 168 h).

La alteración observada en la osmoregulación de los juveniles de *L. setiferus* fue consecuencia de las alteraciones observadas en las diversas respuestas evaluadas responsables del mantenimiento del balance iónico y osmótico de los camarones y se relacionó con la capacidad osmoreguladora de los camarones. La presión osmótica sólo se modificó en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l en ambas salinidades. La baja pero significativa alteración de la presión osmótica así como su rápida recuperación y su estabilidad posterior, sugiere que el organismo está invirtiendo energía en mantener la estabilidad de su medio interno, lo cual sólo se ve reflejado en el consumo de oxígeno en los camarones evaluados en 17 ups. La exposición al cadmio ocasionó la inhibición de la actividad enzimática de la actividad de la Na⁺-K⁺/ATPasa branquial, observandose los mayores efectos en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l. En 10 ups el efecto fue tiempo-dependiente y fue reversible el daño enzimático; en 17 ups el efecto fue concentración-dependiente y la inhibición enzimática fue irreversible en la mayor concentración del cadmio. En esta condición, la represión enzimática se relacionó con la mayor bioacumulación del cadmio en la branquia de los camarones.

La exposición al cadmio alteró la ióno-regulación del Na⁺, K⁺ y Cl⁻, dependiendo de la salinidad del medio. En ambas salinidades, los niveles de Na⁺ en hemolinfa fueron modificados sólo por la exposición a 0.18 mg Cd/l; en contraste, el K⁺ fue alterado solamente en 17 ups y en la mayor concentración de cadmio. El Cl⁻ fue modificado de manera concentración-dependiente en ambas salinidades; en 17 ups el Cl⁻ fue modificado por la exposición subletal a 0.10 y 0.18 mg Cd/l, mientras que en 10 ups sólo fue alterado en la mayor concentración del metal. No obstante, la regulación iónica del Na⁺, K⁺ y Cl⁻ se recuperó en un medio libre del metal y procedió de manera más rápida para los iones Na⁺ y K⁺. Las modificaciones observadas en la regulación iónica del Na⁺ y K⁺ no se relacionaron directamente con la alteración observada en la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa branquial.

En los juveniles de *L. setiferus*, la exposición al cadmio ocasionó una pequeña pero significativa deshidratación solamente en los camarones evaluados en 10 ups, lo cual sugiere alteraciones en la permeabilidad corporal de los juveniles.

La concentración de proteína total en hemolinfa se incrementó significativamente por la exposición al cadmio en mayor proporción en los camarones evaluados en 10 ups, salinidad en la cual la biodisponibilidad de los iones del cadmio es mayor. Dicho incremento sugiere una estrategia para reducir el efecto tóxico del metal a través de su enlace a las proteínas.

Durante la exposición al metal, la bioacumulación del cadmio fue mayor en el hepatopáncreas que en la branquia de los camarones en ambas salinidades. No obstante, la acumulación del cadmio en la branquia fue mayor en 17 ups que en 10 ups. En un medio libre del metal la tasa de eliminación del cadmio fue más elevada en el hepatopáncreas que en la branquia, principalmente en 10 ups y en los camarones con exposición previa a 0.10 mg Cd/l. En 17 ups, la bioacumulación del metal persistió en ambos tejidos, particularmente en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l. En ambas salinidades, la inducción de metalotioneínas fue mayor en la branquia que en el hepatopáncreas de *L. setiferus*, pero su síntesis se

relacionó con la bioacumulación del metal sólo en los camarones expuestos al cadmio en 10 ups. En un medio libre del metal la reducción de las metalotioneínas fue mayor en el hepatopáncreas de los camarones en ambas salinidades. La relación entre las metalotioneínas en la branquia y en el hepatopáncreas con el incremento en las proteínas en la hemolinfa sugiere que la transferencia del metal de la branquia al hepatopáncreas a través de la hemolinfa ocurre fundamentalmente por el enlace del cadmio a las metalotioneínas y es más rápida en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l en 10 ups. La persistencia del cadmio bioacumulado en un medio libre del metal en contraste a la recuperación en la regulación iónica y osmótica de los camarones, sugiere la participación de otros mecanismos de desintoxicación y protección celular al efecto tóxico del metal.

El consumo de oxígeno se incrementó solo en los camarones evaluados en 17 ups y expuestos a la mayor concentración de cadmio, incremento que se mantuvo en la etapa de recuperación. Este aumento se relacionó con la mayor acumulación del metal en la branquia y puede ser consecuencia de la participación de mecanismos compensatorios para reducir la acción tóxica del metal. La recuperación en la osmoregulación de los juveniles de *L. setiferus* es reflejo de la participación de diversos mecanismos de compensación y desintoxicación al cadmio que demandan un gasto energético para mantener la homeostasis de su medio interno y opera de manera diferente dependiendo de la capacidad osmoreguladora de los camarones.

III. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de osmoregulación de <i>L. setiferus</i> . El valor del punto isosmótico es de 525 mOsm/Kg (17 ups) (Ríos, 2001).....	8
Figura 2. Velocidad de entrada de iones Cd^{2+} libres ($\mu g\ l^{-1}$) en el organismo en relación a la salinidad del medio y a la concentración ambiental del metal (tomado de Newman, 1996).....	9
Figura 3. Sistema respirométrico de flujo continuo.....	20
Figura 4. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la presión osmótica de la hemolinfa de <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio en dos salinidades: 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....	28
Figura 5. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de Na^+ de la hemolinfa de <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....	29
Figura 6. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de K^+ de la hemolinfa de <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y durante 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....	33
Figura 7. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de Cl^- en la hemolinfa de <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm E.S.) líneas punteadas.....	34
Figura 8. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) del contenido de proteína total en la hemolinfa de <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....	38
Figura 9. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en branquia de <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....	41
Figura 10. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) del contenido de agua corporal de <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....	43
Figura 11. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) del consumo de oxígeno peso específico en <i>L. setiferus</i> expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....	44

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la acumulación de cadmio en branquia de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....48

Figura 13. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la acumulación de cadmio en el hepatopáncreas de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....51

Figura 14. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de metalotioneínas en branquia de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....54

Figura 15. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de metalotioneínas en hepatopáncreas de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).....55

Figura 16. Regulación de Na⁺ sanguíneo y actividad de Na⁺/K⁺-ATPasa en branquias de *Carcinus maenas*, en relación a la salinidad del ambiente (tomado de Towle, en Pequeux, et al., 1984).....58

IV. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medio de incubación empleado para evaluar la actividad de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa branquial. *Se adicionaron tantos µl necesarios para obtener una concentración de proteína de 25 a 50 µg.....	18
Tabla 2. Temperatura, salinidad, oxígeno disuelto (OD), pH y concentración de cadmio en el agua de las zonas de captura de los juveniles de <i>L. setiferus</i> (promedio ± ES). Entre paréntesis se señalan valores máximos y mínimos.....	25
Tabla 3. Presión osmótica de la hemolinfa (mOsm/Kg) de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	27
Tabla 4. Niveles de sodio (Na ⁺ ; mMoles/l) en la hemolinfa de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	30
Tabla 5. Niveles de potasio (K ⁺ ; mMoles/l) en la hemolinfa de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	32
Tabla 6. Niveles de cloro (Cl ⁻ ; mMoles/l) en la hemolinfa de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	35
Tabla 7. Proteína total en la hemolinfa (mg/ml) de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	37
Tabla 8. Actividad enzimática de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (µMol Pi/mg proteína/h) en branquia de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	40
Tabla 9. Porcentaje de agua corporal de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	42
Tabla 10. Consumo de oxígeno peso específico (mg O ₂ h ⁻¹ g ⁻¹ PH) de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	45
Tabla 11. Comparación del contenido de cadmio en hepatopáncreas de <i>Homarus americanus</i> (TORT-2) contra el valor medido. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	46
Tabla 12. Acumulación de cadmio en branquia (mg/g tejido PS) de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	47

Tabla 13. Acumulación de cadmio en hepatopáncreas (mg/g tejido PS) de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	50
Tabla 14. Metalotioneínas en branquia (µg/mg tejido PH) de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	53
Tabla 15. Metalotioneínas en hepatopáncreas (µg/mg tejido PH) de los juveniles de <i>L. setiferus</i> evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.....	56
Tabla 16. Actividad de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa publicados para diferentes crustáceos en presencia de cadmio. ↑ incremento; ↓ disminución.....	61
Tabla 17. Efecto en la capacidad osmorreguladora y regulación iónica reportada para diferentes crustáceos con presencia de cadmio: PO (Presión Osmótica); CO (Capacidad Osmoreguladora); ↑ incremento; ↓ disminución.....	66

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación marina por metales pesados es evidente en las zonas costeras como consecuencia de las actividades humanas asociadas a las descargas industriales y municipales, a la actividad petroquímica, a los aportes agrícolas y por algunos procesos naturales. En el ambiente acuático, los principales reservorios abióticos son la columna de agua, los sedimentos suspendidos y depositados, y el agua intersticial. Cuando se alteran las condiciones redox en los sedimentos se puede generar un incremento en las concentraciones biodisponibles de los metales y así, por procesos de difusión, compactación y bioturbación afectar la concentración de los mismos en aguas sobreadyacentes. (Paéz-Osuna, 1996a).

En particular, los sistemas lagunares estuarinos, son receptores de elevadas concentraciones de contaminantes de origen antropogénico, incluidos los metales pesados. En estos sistemas se detectan numerosos metales pesados sin función biológica conocida que presentan un elevado potencial tóxico, entre los que se puede mencionar el mercurio, el cadmio y el plomo. Particularmente el cadmio, es considerado como uno de los elementos más adversos para la biota acuática (Giesy et al. 1980).

La coordinación atómica del cadmio determina una fuerte afinidad para iones halogenuro y tiende a formar fuertes complejos con iones orgánicos en ambientes marinos, por lo que su concentración como ión libre suele ser baja. Es conocido que la acomplejación del cadmio modifica la bioacumulación y la biotoxicidad siendo los iones de Cd^{2+} la forma más tóxica (Saquid, 1992). La bioacumulación del cadmio en la biota acuática es dependiente de la forma química presente en los que los iones libres (Cd^{2+}) se absorben más rápidamente que los complejos orgánicos e inorgánicos. Al incrementar la salinidad del medio, la acumulación del cadmio es menor, debido a que disminuyen las concentraciones de iones Cd^{2+} libres y aumentan las del complejo Cd-Cl; en contraste, en los sistemas estuarinos y de agua dulce, los iones libres constituyen una porción considerable del total de cadmio disuelto, lo cual aumenta su biodisponibilidad. Por esta razón los organismos de agua dulce y estuarinos son considerablemente más sensibles a la toxicidad del cadmio disuelto que los animales marinos, debido a que al disminuir la biodisponibilidad del ión metálico libre, su acumulación es mayor (Saquid, 1992).

La toxicidad de los metales a la biota acuática esta influenciada tanto por factores fisicoquímicos del medio como la salinidad (Rainbow, 1997; Jones 1975), pH (Pequeux, 1995), temperatura (Jones 1975), dureza (Butler, 1998) y biológicos como la edad (Bambang et al., 1995), peso (Lignot et al., 1999), sexo (Legras et al., 2000) y hábitos alimenticios (Lignot et al., 1999; Giesy, 1980).

La entrada de metales del medio a los organismos puede llevarse acabo por dos rutas: una es la pasiva y la otra es dependiente del transporte activo. En el caso de la difusión pasiva facilitada, el metal se une inicialmente a una proteína de la superficie membranal que lo transporta a favor de un gradiente o también por endocitosis, aunque estos mecanismos son de menor importancia en la entrada de metales traza (Rainbow, 1997). El transporte activo es la ruta que siguen los iones mayores como el sodio, potasio y calcio, a través de bombas que requieren energía en forma de ATP, como la $\text{Na}^+ \text{-K}^+ / \text{ATPasa}$ y la $\text{Ca}^{2+} \text{ATPasa}$; sin embargo, moléculas orgánicas o inorgánicas pueden afectar su apertura y selectividad o bloquear el acceso a los iones, como es el caso del cadmio y/o moléculas como el DDT, o bien competir por la entrada en los canales selectivos del calcio como es el caso del Cd^{2+} , Pb^{2+} y del Mn^{2+} (Rainbow, 1997; Simkiss, 1996).

El efecto tóxico del cadmio en la biota acuática se atribuye fundamentalmente a las alteraciones producidas en las funciones bioquímicas y en última estancia en las funciones celulares. Los primeros efectos adversos del cadmio son la alteración de las actividades enzimáticas y los mecanismos de transporte de las membranas celulares, los que a su vez son responsables de las alteraciones metabólicas y fisiológicas de todo el organismo. El cadmio ocasiona la inhibición de numerosas actividades enzimáticas como resultado del enlace del metal a los grupos funcionales (carboxilo, imidazol, etc. y principalmente a los grupos sulfidrilo debido a su alta afinidad), cambiando la estructura terciaria de las moléculas enzimáticas; adicionalmente desacopla la función oxidativa y remueve el Zn^{2+} de las enzimas que lo contienen (Postel et al., 1998; Viarengo and Nott, 1993).

En los crustáceos acuáticos, el efecto de los metales pesados está relacionado con el deterioro funcional y estructural del principal órgano blanco de estos, la branquia. Dicho órgano desempeña

un papel fundamental en el intercambio iónico y gaseoso, en el balance ácido-base, en la excreción nitrogenada, en la regulación hídrica (Spicer y Weber, 1991; Dhavale et al., 1988; Regnault, 1987;) y de manera global en la osmoregulación (Lignot et al. 2000; Pequeux, 1995).

En los crustáceos acuáticos, la osmoregulación es una de las más importantes funciones reguladoras de los organismos y es un mecanismo central en su adaptación al medio. En organismos estuarinos, osmoreguladores activos, la osmoregulación mantiene la homeostasis iónica y osmótica del medio interno de los organismos (Lignot et al. 2000; Pequeux, 1995) y determina su capacidad osmoreguladora la cual ha sido considerada como un indicador de la condición fisiológica de los individuos (Lignot et al. 2000; Lignot et al., 1999; Bambang et al., 1995).

La exposición a los metales pesados y particularmente al cadmio en los crustáceos ocasiona alteraciones en su capacidad iónica y osmoreguladora debido a la disfunción en los mecanismos de la regulación iónica y osmótica. Las causas de este deterioro incluyen alteraciones en la estructura y ultraestructura de los órganos branquial y excretor, modificaciones en la actividad enzimática de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{ATPasa}$, enzima esencial en la regulación iónica y osmótica, cambios en el flujo iónico y alteraciones en las superficies permeables (revisión en Lignot et al., 2000).

La $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{ATPasa}$ es una proteína integral de la membrana de las células y es la responsable del transporte de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana utilizando ATP como energía para ello (Lingrel et al., 1994). La presencia de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{ATPasa}$ en branquias de crustáceos decapodos y su papel en el transporte activo de iones se tiene perfectamente identificada (Pequeux, 1995). Asimismo su ultraestructura y la función asociada a las subunidades que la componen han sido definidas recientemente (Shoshani and Ordaz-Gallo, 2001; Dunbar and Caplan 2001; Blanco and Mercer, 1998; Lingrel and Kuntzweiler, 1994). El ciclo catalítico de la translocación activa del Na^+ y K^+ por la ATPasa comprende una enzima fosforilada intermediaria. En crustáceos, la presencia de cadmio altera el estado de fosforilación de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{ATPasa}$ ocasionando su inhibición, al enlazarse al metal de manera irreversible como ha sido descrito en *Carcinus maenas* (Postel et al., 1998).

La intoxicación crónica con cadmio ocasiona la inhibición de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPasa}$ branquial en el cangrejo *Secilla serrata* (Dhavale, et al. 1988) y en *Carcinus maenas* (Postel et al. 1998), la cual ocasiona a su vez la alteración en el balance iónico y la presión osmótica de los organismos. Niveles de 10 mg/l alteran las concentraciones de Na^+ , K^+ y Cl^- en *Penaeus japonicus* (Bambang, 1995). Asimismo, niveles subletales de cadmio modifican la presión osmótica de juveniles de *Litopenaeus setiferus* relacionados con alteraciones en los niveles de Na^+ , K^+ y Cl^- y en la actividad enzimática de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPasa}$ branquial (Vanegas, 1996). En juveniles de *Penaeus japonicus* la exposición a 2 y 4 mg Cd/l disminuye la capacidad osmoreguladora en un 53 y 47 % a 38 ups y 16 ups (Bambang et al., 1995); en *Palaemon elegans* niveles de 1 a 7.5 mg Cd/l afecta la presión osmótica en 13% de agua de mar, pero no en 60% de agua marina (Chen y Slinn, 1980). A su vez, concentraciones subletales de cadmio producen cambios en la presión osmótica del isopodo *Idotea neglecta* (Jones, 1975) y en *Carcinus maenas* (Thurberg et al., 1973) después de una exposición de 48 h.

La disfunción en la regulación iónica y osmótica de los crustáceos decápodos por efecto de la exposición al cadmio, se ha relacionado a su vez con la desorganización de las células transportadoras de iones u ionocitos de la branquia y la glándula antenal, caracterizados por la presencia de microvellosidades apicales, invaginaciones en la membrana basolateral y numerosas mitocondrias (Pequeux, 1995). Las principales alteraciones observadas incluyen la reducción en el número de mitocondrias y el aumento de su turgencia “hinchamiento”, picnosis celular, vacuolización intracelular, reducción y/o fragmentación de las invaginaciones de la membrana basolateral y presencia de estructuras pseudomielínicas (revisión en Lignot et al., 2000). Tales alteraciones pueden ser en consecuencia responsables de la reducción del área del intercambio iónico, de modificaciones en la regulación del volumen celular y de las alteraciones en los mecanismos de intercambio iónico (fundamentalmente la bomba de $\text{Na}^+\text{/K}^+$), afectando adversamente la regulación iónica y osmótica de los organismos.

En los peneidos, al igual que en los crustáceos decápodos, la regulación osmótica está dada fundamentalmente por la regulación iónica de los iones mayoritarios Na^+ y Cl^- (Castille y Lawrence, 1981a; 1981b, Pequeux, 1995). No obstante la concentración de los proteínas totales en hemolinfa participan de manera importante en el mantenimiento de la presión osmótica de los

organismos por medio de la presión osmótica coloidal oncótica o como precursoras de aminoácidos libres, los cuales tienen una participación como osmoefectores para incrementar o disminuir la osmolaridad de la hemolinfa (Pequeux, 1995).

En los crustáceos decápodos, la hemocianina (pigmento respiratorio) representa del 80 al 95% de la concentración total de las proteínas de la hemolinfa de los organismos. Las proteínas en la hemolinfa desempeñan a su vez un papel fundamental en el transporte de metales (tanto los esenciales como los de sin función biológica conocida) y la subsecuente disponibilidad del metal a otros tejidos (Martín y Rainbow, 1998; Bjerregard 1990).

En crustáceos se ha propuesto que el cadmio puede ser transportado en la hemolinfa como iones libres, transportado con la hemocianina por un proceso de pinocitosis o transportado con amebocytos (Bjerregard, 1990). No obstante, la evidencia obtenida en *Carcinus Maenas* sugiere que la mayor proporción de cadmio incorporado a través de las superficies permeables de la branquia se enlaza a proteínas de alto peso molecular en la hemolinfa, principalmente a la hemocianina y es transportado al hepatopáncreas; este mecanismo explica la rápida transferencia del cadmio de la branquia al hepatopáncreas a través de la hemolinfa (Martín y Rainbow, 1998; Bjerregard, 1990; Wright y Brewer 1979)

La tolerancia de los organismos acuáticos a los metales pesados depende de su capacidad de regular su concentración interna, de acumularlo en formas no tóxicas, o de eliminarlos. En los crustáceos se han identificado diversas vías para ello: la eliminación de metal por la exuvia (revisión en Bjerregaard, 1991; Vanegas, 1996), su compartimentalización y acumulación en lisosomas y en concreciones de calcio y magnesio o fosfato, los cuales son desechados por heces y orina o acumulados en hepatopáncreas y branquia (Bjerregaard, 1991; 1990), así como el enlace del metal a proteínas específicas fundamentalmente metalotioneínas (Legras, et al. 2000; Rainbow, 1997; Bjerregaard, 1990 y 1991; Viarengo, 1985).

A nivel celular, los metales pueden reaccionar con el componente citosólico y usualmente son acomplejados en diferentes formas (por quelación, formación de sales, enlaces sulfhidríficos) a compuestos citosólicos tales como ligandos altamente específicos (metaloproteínas y/o

metalotioneínas). substratos, productos de la actividad enzimática o enzimas mismas (Viarengo, 1985).

En los organismos acuáticos, las metalotioneínas en particular, desempeñan un papel relevante en el metabolismo de los metales (Roesijadi, 1992; Viarengo, 1985). Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular, no enzimáticas y ricas en cisteína. El papel fisiológico de las metalotioneínas no se tiene bien establecido para algunas especies; sin embargo, la conservación a través de la evolución en muchos *Phyla* sugiere que estas desempeñan un papel importante en la función celular que incluyen: a) la participación en el mantenimiento de la homeostasis de los metales traza esenciales, fundamentalmente Cu y Zn actuando como reservorios de metales esenciales que pueden ser donados a otras metaloproteínas; b) el secuestro de metales tóxicos como el cadmio y el mercurio y el exceso de los metales esenciales y c) la protección contra el daño oxidativo intracelular (Moilanen, 1999; Klaassen, et al. 1999; Roesijadi, 1992; Viarengo, 1985). De esta manera, las metalotioneínas desempeñan un papel relevante en la biota acuática como mecanismo de desintoxicación de los metales pesados y de protección celular de sus efectos tóxicos.

En crustáceos, se ha reportado la inducción de las metalotioneínas por la exposición a metales pesados y en particular al cadmio. En *Procambarus clarkii* la exposición al cadmio induce la síntesis de metalotioneínas en el hepatopáncreas (Martinez et al., 1993); el Cu y el Zn induce la síntesis de metalotioneínas en branquia y hepatopáncreas de *Carcinus maenas* (Legras et al., 2000; Pedersen et al., 1997), pero solo en el hepatopáncreas del cangrejo *Pachygrapsus marmoratus* (Legras et al., 2000). En estas especies, la concentración de metalotioneínas se relaciona con la acumulación tisular de los metales.

En ambientes contaminados, las alteraciones biológicas y en última instancia, la sobrevivencia de los organismos es el resultado de la bioacumulación de los metales, producto del deterioro del balance entre las tasas de incorporación y las tasas de desintoxicación y excreción de los tóxicos (Legras et al., 2000; Rainbow et al., 1993).

El camarón blanco *Litopenaeus setiferus* habita ambientes marinos y lagunares-estuarinos dependiendo de la etapa de su ciclo de vida. Durante su etapa adulta permanece en el ambiente marino en condiciones fisicoquímicas estables; en los estadios de postlarva y juvenil habita en sistemas lagunares estuarinos donde los factores fisicoquímicos varían ampliamente y en mayor magnitud la salinidad y la temperatura (Charmantier, 1998; Pequeux, 1995). En el medio lagunar-estuarino, los camarones son particularmente sensibles al efecto tóxico de los metales pesados debido a la combinación del estrés salino y al incremento en la biodisponibilidad de los iones metálicos en bajas salinidades.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Al igual que otras especies de peneidos, *L. setiferus* dependiendo de la etapa de su ciclo de vida habita ambientes marinos y lagunares-estuarinos, siendo en la etapa de postlarva cuando penetra en el sistema lagunar y en donde se lleva a cabo su desarrollo hasta la etapa de juvenil y preadulto (Gracia, 1989 y Williams, 1984). En la etapa juvenil, la regulación osmótica es crítica debido a las amplias fluctuaciones en la salinidad del medio (Lignot et al. 1999). En particular, los juveniles de *L. setiferus* presentan una amplia capacidad osmoreguladora; hiporegulando en salinidades mayores a su punto isosmótico e hiperregulando en salinidades menores a ésta (Ríos, 2001; Rosas et al., 1999; Castille y Lawrence, 1981a, Williams, 1960). El punto isosmótico de juveniles de *L. setiferus* (1.76 ± 0.29 g PH) ha sido determinado en estudios previos en nuestro laboratorio en 525 mOsm/Kg (Fig. 1) correspondiente a una salinidad de 17 ups (Ríos, 2001). Estos resultados difieren a los obtenidos por McFarland y Lee (1963) en 850 mOsmol/kg para camarones de 100 mm de longitud; por Castille y Lawrence (1981b) de 680 mOsmol/kg correspondiente a 23.3 ups en juveniles de 56-108 mm y a los obtenidos por Rosas et al. (1999) de 717 mOsmol/Kg correspondiente a 24 ups en juveniles de 2 g PH. Las diferencias obtenidas pueden ser debidas al origen de los organismos (laboratorio-medio natural) o a las diferentes tasas de aclimatación y a los tiempos de estabilización al cambio salino (Lignot et al., 1999; Ferraris et al., 1986; Castille y Lawrence 1981a y b) (Figura 1).

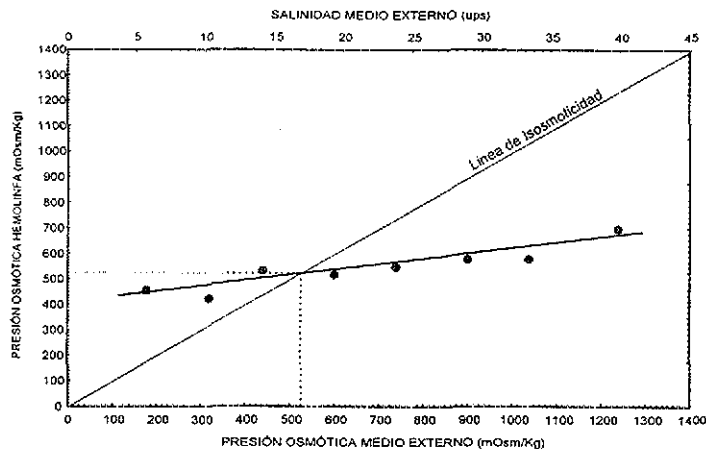


Figura 1. Curva de osmoregulación de *L. setiferus*. El valor del punto isosmótico es de 525 mOsm/Kg (17 ups) (Ríos, 2001).

El cadmio es el metal tóxico más ampliamente encontrado en los ecosistemas acuáticos costeros y marinos. En el Golfo de México, las zonas costeras con las más altas concentraciones de cadmio son Tabasco>Campeche>Veracruz (Villanueva y Botello, 1998; Villanueva y Páez-Osuna, 1996). En la Laguna de Términos, adyacente a la Sonda de Campeche, se registran en el agua elevadas concentraciones de cadmio, zinc, cromo y plomo, así como hidrocarburos derivados del petróleo, sobrepasando los niveles mínimos para la vida acuática (Botello et al., 1992). Para el cadmio, el límite máximo establecido para aguas de zonas pesqueras costeras y aguas estuarinas es de 0.1 a 0.2 mg/l (NOM-001-ECO, 1996) y donde el criterio de protección para la vida acuática en aguas marinas superficiales es de 0.008 ppm (IMP, 2001).

En la Laguna de Términos, habitan los juveniles del camarón café *Farfantopenaeus aztecus*, el camarón rosado *Litopenaeus duorarum* y el camarón blanco *L. setiferus*, destacando este último por su abundancia (Gracia, 1989). Estas poblaciones están sujetas a presiones adicionales como la pesca artesanal y al deterioro de su hábitat. En el ambiente lagunar-estuarino, las concentraciones de iones libres de cadmio están en función de la salinidad del medio, con mayores concentraciones biodisponibles para los organismos en salinidades bajas, lo que a su vez determina una tasa de incorporación más elevada (Fig. 2) (Newman y Jagoe, 1996; Saquid, 1992). Así, la presencia de metales pesados impone un estrés adicional a los procesos de regulación

iónica y osmótica en los juveniles de *L. setiferus* y una mayor demanda energética para la osmoregulación (Lignot et al., 2000; Rosas et al., 1997; Guerin y Stickle, 1995).

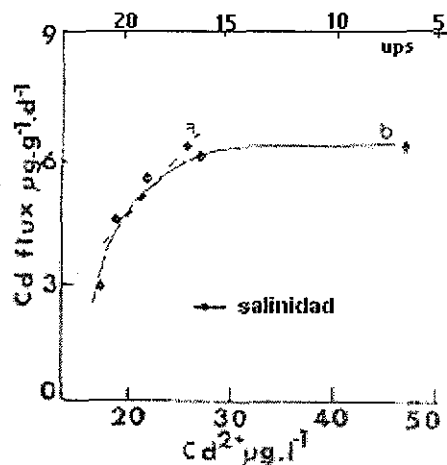


Figura 2. Velocidad de entrada de iones Cd^{2+} libres ($\mu g l^{-1}$) en el organismo en relación a la salinidad del medio y a la concentración ambiental del metal (tomado de Newman y Jagoe, 1996).

Considerando que los juveniles de *L. setiferus* se enfrentan a amplias variaciones de la salinidad en el medio como son los estuarios y que la concentración de iones libres de cadmio está en función de la salinidad, es necesario abordar estudios concernientes a evaluar los efectos tóxicos que ejerce el cadmio sobre los juveniles de la especie en un ambiente de salinidad variable. De tal manera, el presente estudio se centró en abordar el efecto de la exposición subletal al cadmio en la regulación iónica y osmótica de los juveniles de *L. setiferus* tanto en un ambiente isosmótico como en uno hiposmótico. Dado que las alteraciones biológicas se relacionan con la bioacumulación del metal (Saquid et al., 1992; Lignot et al., 2000), se evaluó la concentración del cadmio en la branquia, órgano fundamental en el intercambio iónico de los camarones (Lucu, 1990; Pequeux, 1995; Pequeux et al., 1984) y sitio blanco de la acción tóxica del metal (Dhavale et al., 1988; Guerin y Stickle, 1995); así mismo se cuantificó la concentración de metalotioneínas branquial como probable mecanismo de desintoxicación y protección al efecto adverso del metal (Hogstrand y Haux., 1991; Klaassen et al., 1999).

Adicionalmente se evaluó el efecto tóxico de la exposición al cadmio sobre la tasa metabólica de los camarones como un indicador del costo energético asociado a la regulación iónica y osmótica de los organismos (Gaudy et al., 1991; Depledge, 1984; Thurberg et al., 1973).

A fin de profundizar en los procesos de acumulación, transporte y desintoxicación al cadmio, se cuantificó su acumulación y la concentración de metalotioneínas en el hepatopáncreas de los camarones (Martinez et al., 1993; Bjerregaard, 1990)

1.2 HIPOTESIS

El efecto tóxico del cadmio sobre el balance iónico y osmótico de los juveniles de *L. setiferus* es mayor en salinidades bajas, debido a una mayor concentración de iones libres de cadmio que ingresan al organismo, alterando los mecanismos implicados en la osmoregulación.

Ante una entrada masiva de cadmio resultante en una mayor acumulación de cadmio, es de esperar una mayor inducción de metalotioneínas en branquia y hepatopáncreas como un mecanismo de desintoxicación y protección celular contra el metal.

Las alteraciones biológicas observadas se verán reflejadas en un incremento en la tasa metabólica de los camarones debido al aumento en las demandas energéticas para reducir la acción tóxica del cadmio.

1.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto tóxico de la exposición crónica al cadmio en la osmoregulación de juveniles de *Litopenaeus setiferus* y la capacidad de su recuperación bajo condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el balance iónico y osmótico del medio interno de *L. setiferus* cuantificando los principales iones plasmáticos Cl^- , Na^+ y K^+ , la concentración de proteína total y la presión osmótica de la hemolinfa, en organismos expuestos a diferentes concentraciones subletales de cadmio y niveles de salinidad.
- Evaluar la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa como indicadora del intercambio iónico del Na^+ y K^+ en la branquia.
- Determinar los efectos de la exposición al cadmio sobre el balance hídrico de los organismos.
- Evaluar el consumo de oxígeno de los camarones expuestos a las diferentes concentraciones subletales de cadmio como una respuesta integradora e indicadora de la alteración en la osmoregulación.
- Evaluar la inducción de la síntesis de metalotioneínas en branquia y hepatopáncreas en función de la concentración y el tiempo de exposición al cadmio.
- Establecer la relación existente entre la alteración biológica observada y la bioacumulación del cadmio en el organismo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CAPTURA

Los juveniles del camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (2 a 4.6 g de peso húmedo) se capturaron al sureste de la Laguna de Términos, en el estuario de Atastillo durante el periodo comprendido de septiembre del 2000 a mayo del 2001; la captura se realizó durante la mañana utilizando una red de arrastre de prueba camaronera de 2m de largo y 1.5 m de abertura de trabajo, con una luz de malla de 1 pulgada (Vanegas, 1996). Los arrastres se efectuaron con un tiempo efectivo de arrastre de 1 a 2 min para evitar una mortalidad debida a la captura. Se emplearon las claves de Williams (1984) para determinar a los organismos.

En el sitio de la captura se midió la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto por medio de un oxímetro ISY con sensor polarográfico (± 0.5 mg O₂/l ; ± 0.5 °C), la salinidad con un refractómetro ATAGO (± 0.5 UPS) y el pH con un sensor YSI (± 0.05 unidades). Se tomaron muestras de agua (150 ml) de la zona de captura, para cuantificar la concentración de cadmio presente; las muestras de agua se fijaron con 5 ml de ácido nítrico concentrado y se mantuvieron en refrigeración para su posterior análisis. La cuantificación total de cadmio se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica como lo señala Ponce-Vélez y Botello (1991).

2.2. MANTENIMIENTO

Los camarones capturados se transportaron al Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM ubicado en Ciudad del Carmen, Campeche, en bolsas de polietileno con atmósfera saturada de oxígeno y a una temperatura de 25 ± 1 °C. Ahí los animales se colocaron en contenedores de 500 l con agua de mar previamente filtrada (en conchuela de mar fina, 7 mm diámetro, seguida de arena de mar, 2 mm de diámetro y finalmente con tierra de diatomeas, de 80 μ m) y diluída con agua destilada a la salinidad del sitio de captura. La temperatura se mantuvo en valores ambientales. En estas condiciones los camarones permanecieron un mínimo de 24 h sin alimento para contrarrestar los efectos de la manipulación y

el transporte. Posteriormente los camarones se alimentaron diariamente con alimento balanceado (camaronina, 35% de proteína) al 5% de su peso corporal.

Después de una permanencia de 48 a 72 h en los contenedores y 12 h de ayuno previo, los organismos se trasladaron al laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias de la UNAM en bolsas de polietileno con agua de los contenedores, atmósfera saturada de oxígeno y 25°C de temperatura. Una vez en el laboratorio, se mantuvieron en una densidad de 100 ± 10 organismos en sistemas de 250 litros, equipados con filtro biológico y agua a $\text{pH } 7.8 \pm 0.2$, una concentración de oxígeno disuelto de 5 ± 0.5 mg/l y a la temperatura y salinidad del transporte; el fotoperíodo se mantuvo en 12:12 h luz-oscuridad. En estas condiciones los organismos permanecieron durante 5 días. Posteriormente se separaron dos grupos de organismos en los acuarios de mantenimiento en los que la temperatura y la salinidad se ajustaron gradualmente (1°C y 1 ups/día) hasta alcanzar 28°C y las salinidades experimentales deseadas. Durante todo el período de mantenimiento se les proporcionó diariamente alimento balanceado (camaronina, 35% de proteína; Purina S.A de C.V.) equivalente al 5% de su peso corporal.

2.3. FASE EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto del cadmio sobre la osmoregulación de los juveniles de *L. setiferus* se consideraron dos salinidades experimentales: 17 ± 1 ups (punto isosmótico) y 10 ± 1 ups (condición hiposmótica) (Ríos, 2001). Una vez alcanzadas las salinidades a evaluar, en cada condición los organismos se mantuvieron cuatro días previos a las pruebas experimentales, considerando el antecedente de que los juveniles de *L. setiferus* requieren 4 días para estabilizar su medio interno ante cambios bruscos de salinidad (Ríos, 2001; Vanegas, 1996; Castille y Lawrence 1981a y b).

Por cada salinidad, 285 camarones se transfirieron de los acuarios de mantenimiento y se distribuyeron en 12 acuarios de 40 l (24 organismos por acuario) manteniéndolos durante 24 h sin alimento como periodo de aclimatación por el estrés de la manipulación, previo a la adición del metal (Vanegas et al., 1999). Las condiciones de temperatura, oxígeno disuelto y pH, se

mantuvieron similares al periodo de mantenimiento. Cabe señalar que los camarones utilizados se encontraban en etapa de intermuda, determinada de acuerdo a Robertson et al.(1987).

La selección de las concentraciones subletales de cadmio utilizadas en el presente estudio se basó en estudios previos en los juveniles de *L. setiferus* ($CL_{50} = 0.99 \pm 0.2$ mg/l; Vanegas, 1996); considerando concentraciones del metal en las que se presentó una mortalidad estimada menor al 1%. En cada salinidad, los camarones se expusieron a dos concentraciones subletales del metal: 0.10 y 0.18 mg Cd/l; en cada caso se consideró un grupo testigo (sin adición del metal). Las concentraciones de cadmio empleadas se prepararon a partir de una solución madre conocida de $CdCl_2$ (99.8 % de pureza; Sigma). El efecto tóxico subletal del cadmio se evaluó a través de bioensayos estáticos con recambio.

Durante el período de exposición de 5 días, se efectuaron diariamente recambios del 50% del volumen de los acuarios y se renovaron las concentraciones respectivas del cadmio. Antes del recambio, se tomaron muestras de 150 ml agua para verificar la concentración total del cadmio presente.

En cada combinación salinidad-concentración de Cd experimental, la evaluación de las diversas respuestas indicadoras del efecto tóxico del cadmio sobre la osmoregulación de los camarones y su relación con probables mecanismos de desintoxicación, se efectuaron a las 0, 24, 72 y 120 h de exposición. En cada período se analizaron 15 organismos de cada concentración y salinidad, seleccionados al azar. Al terminó de la exposición, los camarones restantes se transfirieron a acuarios libres de cadmio con el fin de evaluar su recuperación durante 7 días. De manera similar se tomaron 15 organismos a las 24, 72 y 168 h para determinar su recuperación.

Durante el periodo de exposición y de recuperación se mantuvo el mismo régimen de alimentación y recambio de agua descrito previamente, al igual que la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y el fotoperíodo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4. RESPUESTAS EVALUADAS

2.4.1. OSMOREGULACIÓN

El efecto subletal del cadmio sobre la regulación iónica y osmótica de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* se estableció a partir de la evaluación de diferentes respuestas: la presión osmótica del medio interno, la concentración de los iones plasmáticos Cl^- , Na^+ y K^+ , la proteína total en hemolinfa y la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa como indicadora del intercambio activo del Na^+ y K^+ en el epitelio branquial de los camarones. Así mismo se evaluó el contenido corporal de agua y el consumo de oxígeno de los camarones expuestos a las diferentes condiciones experimentales. Tales respuestas se evaluaron durante el periodo de exposición (0, 24, 72, 120 h) en cada salinidad (10 y 17 ups) en las diferentes concentraciones subletales de cadmio (0.10 y 0.18 mg Cd/l) y durante el periodo de recuperación (24, 72 y 168 h).

2.4.1.1 Presión Osmótica

La determinación de la presión osmótica del medio interno de los camarones de cada condición experimental se efectuó en 10 organismos y en muestras de 20 μl de la hemolinfa extraída del seno infra-branquial (membrana torácico-abdominal) de cada camarón. La hemolinfa se extrajo por medio de una jeringa de 1 ml enjuagada con una solución de 0.75 mg/l de heparina (sal de amonio); previamente se secó cuidadosamente la zona para evitar contaminación con el agua del medio. Todo el procedimiento se realizó en frío. Las muestras se diluyeron con agua desionizada en una proporción 1:10. La presión osmótica de las muestras diluidas se determinó en un microsmómetro ADVANCED 3300 (± 0.05 mOsm/l). Posteriormente se efectuaron las correcciones respectivas por la dilución efectuada por medio de la ecuación: $Y = 0.105X - 3.234$ ($p > 0.05$; $R^2 = 0.99$) donde Y y X corresponden a la presión osmótica (mOsmol/Kg) de muestras conocidas con dilución y sin dilución respectivamente (Anexo I).

2.4.1.2. Iones Plasmáticos

La concentración de los iones plasmáticos Na^+ , K^+ y Cl^- (mMoles/l) de los organismos provenientes de las diferentes condiciones experimentales se evaluaron en alícuotas de 50 μl de la hemolinfa obtenida y diluida. Los iones se determinaron por medio de un microanalizador de iones específicos Easy Lyte Plus (± 0.05 mMoles/l). Asimismo se efectuaron las correcciones respectivas por la dilución efectuada por medio de las ecuaciones:

$$\text{Sodio: } Y = 0.105X - 1.648 \quad (R^2=0.97)$$

$$\text{Potasio: } Y = 0.105X + 0.312 \quad (R^2=0.82)$$

$$\text{Cloro: } Y = 0.098X - 0.179 \quad (R^2=0.97)$$

donde Y y X corresponden a la concentración de iones (mMoles/l) de muestras conocidas con dilución y sin dilución respectivamente (Anexo I).

2.4.1.3. Proteína Total

La determinación de las proteínas totales de la hemolinfa de los camarones se realizó en alícuotas de 10 μl de la hemolinfa diluida (1:10) mediante el Kit de ensayo de proteínas (BIO-RAD) basado en la técnica de Bradford y utilizando el método de macroensayo. Este análisis involucró la adición de una solución ácida del colorante de Azul Brillante de Coomassie (G-250) donde la intensidad del color es proporcional a la concentración de proteína de la muestra. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro SPECTRONIC 21 (Bausch and Lomb) a 595 nm. Los resultados se transformaron a mg proteína/ml a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

2.4.1.4. Actividad Enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa en Branquia

Para el análisis de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial de los camarones, se evaluó inicialmente la concentración de la proteína total en el tejido. La determinación del contenido de **proteína totales branquiales** se realizó con el objetivo de tener una concentración de proteína conocida (25 a 50 μg) para asegurar la suficiente cantidad de enzima requerida para el análisis de actividad enzimática. La determinación de las proteínas es necesaria debido a que la

actividad de las enzimas (como la Na^+/K^+ -ATPasa) se expresa como UI (Unidad Internacional) por mg de proteína o como concentración del producto ($\mu\text{MolPi}/\text{mg}$ proteína). Solo se analizaron los últimos tres pares posteriores de los filamentos branquiales, ya que es el principal sitio de intercambio iónico en los crustáceos (Pequeux, 1995; Lucu, 1990).

Los análisis se efectuaron en 6 de los juveniles de *Litopenaeus setiferus* seleccionados al azar de cada condición experimental de acuerdo a lo señalado por Tentes y Stratakis (1991; modificado). Se separó el cefalotórax del abdomen y se removieron las branquias, enjuagándolas con una solución fría de sacarosa 0.25 M y EDTA 6 mM. Se seleccionaron los tres últimos pares branquiales posteriores y se volvieron a enjuagar con la solución de sacarosa; se secaron con papel absorbente y se pesaron. El peso de los filamentos branquiales analizados por organismo fue de 12 ± 3 mg PH. Dichos filamentos se homogenizaron en una solución amortiguadora que contenía: 0.25 M Sacarosa, 6 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 30 mM Imidazol y 10 μM PMSF a un pH de 6.8 en frío, considerando una relación de 40 $\mu\text{l}/\text{mg}$ branquia. Se utilizó un homogenizador de pistilo de teflón a 25 000 rpm por 60 segundos a aproximadamente 4°C. Este homogenado crudo se centrifugó a 10 000 g (Eppendorf 5417R, rotor F45-30-11) por 30 min a 4°C. El sobrenadante (4.2 ml) se colocó en un tubo de ensayo seco y la pastilla se resuspendió con 1.2 ml de la solución buffer volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones, a fin de remover todo resto celular. El sobrenadante postmitocondrial se separó y se combinó con el primero.

De cada muestra de homogenado centrifugado se tomó una alícuota de 25 μl y se adicionó 1.25ml del colorante de BIO-RAD diluido 1:4 (método de macroensayo); se agitó en vortex y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Las muestras se analizaron por duplicado y se incluyó un blanco reactivo. Inmediatamente después de la incubación, se efectuaron las lecturas de absorbancia de las muestras a 595 nm con un espectrofotómetro SPECTRONIC 21 (Bausch and Lomb). A partir del contenido de proteína total de este homogenizado centrifugado se determinó el volumen requerido, con el fin verificar el tener una concentración de proteína total de 25 a 50 μg mínimo en el homogenado que es la adecuada para asegurar la reacción al momento de iniciar el análisis de ATPasas. Los resultados se expresaron en mg proteína/ml a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina.

La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial se efectuó de acuerdo al método propuesto por Tentes y Stratakis (1991; modificado) y Postel, et al. (1998; modificado). La actividad enzimática se evaluó en los organismos a los que se le retiraron los últimos tres pares posteriores de los filamentos branquiales. Cabe señalar que si bien en la literatura se señala que la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa es evaluada preferentemente en la fracción microsomal, de acuerdo a Tentes y Stratakis (1991) la actividad específica de la enzima es similar al ser evaluada tanto en el sobrenadante (de 10 000 g) como en los microsomas (pastilla de 100 000 g). De tal manera que en este estudio se consideró la evaluación de la actividad enzimática en el sobrenadante obtenido a 10 000 g para el análisis de proteínas totales señalado previamente.

La actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de fosfato inorgánico liberado del ATP en ensayos realizados en medio de incubación en ausencia de ouabaina (ATPasa total) y en presencia de ella (Mg ATPasa) (Tabla 1).

Tabla 1. Medio de incubación empleado para evaluar la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial. *Se adicionaron tantos μl necesarios para obtener una concentración de proteína de 25 a 50 μg .

SOLUCIONES	SIN OUABAINA	CON OUABAINA
130 mM NaCl	---	30 μl
100 mM NaCl	30 μl	---
30 mM KCl	30 μl	---
20 mM Imidazol pH 7.2	30 μl	30 μl
1 mM Ouabaina	---	30 μl
Agua Desionizada	x μl	x μl
Homogenado centrifugado*	x μl	x μl
Total de solución	300 μl	300 μl
Inicio de reacción con		
5 mM ATP en 10 mM MgCl	30 μl	30 μl

Se tomaron del homogenado centrifugado tantos μl del centrifugado de acuerdo al análisis de proteína efectuado anteriormente para tener una concentración total de 25 a 50 μg de proteína al momento de la reacción, los cuales se adicionaron a una solución que contenía: 100 mM NaCl, 30 mM KCl y 20 mM Imidazol a pH 7.2 (ATPasa Total); así mismo, se adicionó la misma cantidad de homogenado a una solución que contenía: 130 mM NaCl, 20 mM Imidazol a pH 7.2 y 1 mM Ouabaina (Mg²⁺-ATPasa). Ambas soluciones se ajustaron a un volumen final de 300 μl con agua bidestilada-desionizada; todo el procedimiento se efectuó por triplicado. En ambos casos, la

reacción se inició con la adición de 10 mM MgCl y 5 mM ATP, incubándose a 30°C por 15 min bajo agitación constante. Al término de la incubación se detuvo la reacción agregando 0.9 ml de TCA al 8%, manteniendo en reposo las muestras por 10 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 2000 g por 10 min.

La actividad de la ATPasa se analizó colorimétricamente en el sobrenadante, en el cual se le midió el fósforo inorgánico liberado del ATP por las ATPasas presentes en la muestra mediante el método de Ames (Ames, 1966), a partir de la medición de la cantidad de fósforo inorgánico en forma de fosfomolibdato de amonio, el cual da una tonalidad azul. Con este fin, se tomaron 50 µl del sobrenadante y se le adicionaron 250 µl de agua desionizada y 700 µl de reactivo de Ames, consistente en 6 vol de molibdato de amonio al 0.42% en 1 vol de ácido sulfúrico 1N y 1 vol de ácido ascórbico al 10%; las muestras se agitaron y se incubaron posteriormente a 45°C por 20 min. Los ensayos se realizaron por duplicado. Posteriormente, se leyeron las muestras, una dilución estándar de fosfato (0.5 µg Pi/ml) y un blanco (0 µg Pi/ml) a una absorbancia de 820 nm con un espectrofotómetro SPECTRONIC 21 (Bausch and Lomb).

La actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa branquial se calculó como micromoles de fósforo inorgánico liberado (Pi) por miligramo de proteína por hora (µmol Pi/mg Proteína/h) resultante de la diferencia entre las muestras incubadas en ausencia y en presencia de ouabaina.

2.4.1.5. Contenido de Agua Corporal

Cinco camarones provenientes de las diferentes condiciones experimentales, se secaron con papel absorbente y se obtuvo el peso húmedo (mg PH) en una balanza analítica Sartorius (±0.0001). Posteriormente los organismos se deshidrataron a 60°C por 48 h en una estufa BLUE-M ± 1°C para obtener el peso seco (mg PS). El contenido porcentual de agua en los camarones se calculó por la diferencia de peso húmedo (PH) y el peso seco (PS) de los organismos mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Agua} = ([\text{PH, g} - \text{PS, g}] / \text{PH, g}) \times 100$$

2.4.1.6. Consumo de Oxígeno

El consumo de oxígeno de los organismos se evaluó a través un sistema de flujo continuo y termostregulado (Figura 3) constituido por 11 cámaras respirométricas de vidrio de 430 ml de capacidad.

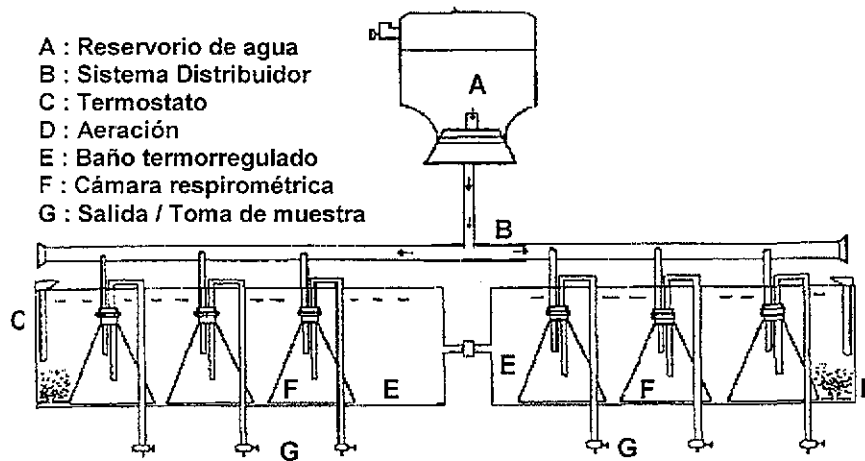


Figura 3. Sistema respirométrico de flujo continuo.

Para evaluar el efecto del cadmio en los camarones expuestos en cada una de las concentraciones de cadmio (0, 0.10 y 0.18 mg Cd/l) y evaluados en cada salinidad (17 y 10 ups), se emplearon 10 juveniles por cada tiempo de exposición (0, 24, 72 y 120 h) y de recuperación (24, 72 y 168 h) mantenidos en ayuno previo 24 h. Los camarones se colocaron de manera individual en las cámaras respirométricas con agua a la concentración de cadmio evaluada y a la temperatura y salinidad de los acuarios de exposición-recuperación; se consideró una cámara sin organismo como testigo. Los organismos permanecieron en dichas cámaras durante 2 horas con flujo continuo con una velocidad de 1.16 ± 0.22 l/h previo a las mediciones con el fin de disminuir el estrés ocasionado por la manipulación (Molina et al, 1997). Después de este periodo se midió la concentración de oxígeno disuelto ($\text{mg O}_2/\text{l}$) en muestras de agua a la entrada ($[\text{O}_2]_e$) y a la salida ($[\text{O}_2]_s$) de cada cámara por medio de un oxímetro YSI con sensor polarográfico (± 0.5 $\text{mg O}_2/\text{l}$; ± 0.5 $^\circ\text{C}$) y se midió el flujo de agua (F; ml/h). Estas mediciones se repitieron dos veces más con un intervalo de dos horas entre ellas. En todos los bioensayos, las evaluaciones del consumo de oxígeno se iniciaron a las 7:30 hrs y se terminaron a las 15:00 hrs.

El consumo de oxígeno individual (VO_2 ; $mg\ O_2\ h^{-1}\ organismo^{-1}$) se calculó de acuerdo a la fórmula (Cech, 1990):

$$VO_2 = ([O_2]_e - [O_2]_s) * F$$

Los valores se corrigieron por los obtenidos en la cámara testigo, sin organismo. Al terminó de las pruebas los camarones se sacrificaron y se registró el peso húmedo (g PH). Los resultados del consumo de oxígeno individual se relacionaron con el peso de cada organismo y se obtuvo el consumo de oxígeno peso específico (QO_2 ; $mg\ O_2\ h^{-1}\ PH^{-1}$) de los camarones.

2.5 Bioacumulación de Cadmio

Con el fin de establecer la relación causa-efecto de la exposición al cadmio sobre la osmoregulación de los camarones, se evaluó la concentración del metal en la branquia de los organismos, órgano fundamental en la regulación iónica y osmótica de los crustáceos acuáticos (Pequeux, 1995; Lucu, 1990). Asimismo se determinó la bioacumulación del cadmio en el hepatopáncreas con el propósito de profundizar en los mecanismos de eliminación y transferencia del metal desde la branquia al hepatopáncreas de los camarones a través de la hemolinfa.

La acumulación del cadmio se analizó en las branquias y hepatopáncreas de 6 camarones provenientes de cada condición experimental. Los organismos se disectaron en frío. Los tejidos se lavaron previamente con agua bidestilada desionizada, se pesaron (PH) y se liofilizaron hasta obtener su peso seco (PS). Posteriormente los tejidos fueron digeridos en un horno de microondas Modelo MDS-2000 de CEM en vasos ACV de teflón; la branquia fue digerida con 1.5 ml de HNO_3 concentrado Supra puro (70%) a una presión controlada de 40, 60, 80, 100 y 120 PSI en intervalos de 3 minutos y $100^\circ C$ y el hepatopáncreas con 2 ml de HNO_3 concentrado Supra puro (70%) a una presión controlada de 20, 40, 80, 110, 140 PSI en intervalos de 3 y 5 minutos a $100^\circ C$. La concentración de cadmio presente en el tejido se determinó por medio de espectrofotometría de absorción atómica con un equipo VARIAN SpectrAA 220, utilizando una flama Aire-Acetileno y un flujo de 13.5 l/min (aire) y 2.0 l/min. (acetileno) con un límite de resolución del 5%, empleando una lámpara de Cadmio de cátodo hueco, con una corriente de 4 mA. Las concentraciones del metal de los tejidos se estimaron a partir de una curva de soluciones

estándar de 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mg Cd/l (estándar de referencia 1 mg Cd/ml en 1% HNO₃; SIGMA). El equipo se calibró cada 15 muestras leídas. El contenido de cadmio cuantificado en los tejidos y la calibración del equipo se valoró utilizando el tejido de referencia TORT-2, (hepatopáncreas de Langosta *Homarus americanus*), proporcionada por la National Research Council, Canadá.

Los resultados obtenidos se expresaron en mg Cd/mg PS de tejido.

2.6 Concentración de Metalotioneínas

Se evaluó la concentración de metalotioneínas (MT) en la branquia y en el hepatopáncreas de los juveniles de *L. setiferus* como un mecanismo probable de desintoxicación y protección celular al cadmio acumulado en los tejidos por la exposición al metal. La determinación de las metalotioneínas en los tejidos se realizó en cuatro organismos provenientes de cada condición experimental, tanto de las fases de exposición como de recuperación, de acuerdo al procedimiento propuesto por Scheuhammer y Cherian (1986), modificado en el presente estudio. El hepatopáncreas y las branquias disectadas se enjuagaron con una solución fría de sacarosa 0.25 M y EDTA 6 mM, se secaron con papel filtro y se tomó su peso húmedo (PH); se obtuvieron pesos de 0.1 a 0.25 g PH de hepatopáncreas y de 0.02 a 0.07 g PH de branquias. Los tejidos se colocaron en tubos eppendorf y se congelaron inmediatamente a -70°C para su posterior análisis.

Posteriormente cada órgano se homogenizó en una solución fría de sacarosa 0.25 M en una relación de 4:1 mediante un homogenizador POLYTRON PT 1200 y un generador PT-DA 12072EC a 25 000 rpm. El homogenado se centrifugó a 14 000 g durante 20 min a 4°C. Se separó la fracción sobrenadante y se colocaron alícuotas de 400 µl en tubos eppendorf de 2 ml. Se adicionaron 400 µl de glicina 0.5 M a pH 8.5 y 500 µl de solución de plata (20 µg/ml) en glicina. Se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad con el fin de saturar los sitios de unión de las metalotioneínas.

El exceso de plata se removió adicionando 100 µl de hemolizado de sangre de rata Winstar, machos adultos de 400 g (RCB), preparado como es descrito por Onosaka y Cherian (1982),

seguido de un tratamiento de calor con baño María a 100°C por 1.5 a 2 min. Este tratamiento de calor precipita la plata unida a la hemoglobina del hemolizado y a otras proteínas, excepto las metalotioneínas que son estables al calor. Las proteínas y la hemoglobina desnaturalizadas se removieron por centrifugación a 1 200 g por 5 min. Este procedimiento: hemolizado-calor-centrifugación se repitió dos veces. Se retiró el sobrenadante, se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó nuevamente a 15 000 g por 5 min. El sobrenadante se retiró y se congeló a -70°C para su análisis posterior de la concentración de plata.

Para determinar la concentración de plata en las muestras, el sobrenadante se descongeló y se aforo a 5 ml con agua desionizada. La concentración del metal se analizó por espectrofotometría de absorción atómica con un equipo VARIAN SpectrAA 220, utilizando una flama Aire-Acetileno y un flujo de 13.5 l/min (aire) y 2.0 l/min. (acetileno) con un límite de resolución del 5%, empleándose una lámpara de Plata de cátodo hueco, con una corriente de 4 mA. Para la curva de calibración se emplearon estándares de 0, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 µg/l Ag (estándar de referencia de 1 mg Ag/ml en 1% HNO₃; SIGMA) en buffer de glicina 0.5 M, calibrando el equipo cada 10 muestras leídas.

La cantidad de metalotioneínas (MT) presentes en el sobrenadante final, se determinó por la cantidad de plata contenida mediante la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g MT} = \frac{([\text{Ag; mg/l}]_m - [\text{Ag; mg/l}]_b) * 3.55 * V_h; \text{ ml} * F_d}{V_a; \text{ ml}}$$

donde:

m= muestra de tejido, branquia o hepatopáncreas (mg PH)

b= blanco de reactivos

3.55= constante de estabilidad del enlace Ag-MT

Fd= factor de dilución (1:5 o 1:10)

Vh= volumen total del homogenado (ml)

Va= volumen de aforo total (ml)

La concentración de metalotioneínas presentes en los tejidos se expresó como $\mu\text{g MT/mg PH}$, considerando el peso (mg PH) de cada tejido.

2.7 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en cada tiempo del bioensayo durante la exposición-recuperación, se analizaron previamente mediante un análisis exploratorio de datos (análisis de normalidad y de residuos) a fin de eliminar datos atípicos. Para conocer el efecto de la exposición subletal al cadmio sobre las diferentes respuestas evaluadas, los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$ para comparar el efecto de la concentración del metal (testigo, 0.10 y 0.18 mg Cd/l) en cada etapa de exposición y recuperación, el efecto de la salinidad (17 y 10 ups) y la interacción entre la concentración del cadmio con la salinidad en cada etapa (exposición-recuperación) del bioensayo. Asimismo se utilizó una ANOVA de una vía para determinar el efecto significativo del tiempo de exposición-recuperación en cada concentración de exposición. Las diferencias significativas de cada uno de los grupos comparados se establecieron mediante el análisis de comparación múltiple de Newman-Keuls con un nivel de significancia de $p < 0.05$ (Zar, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. RESULTADOS

Los valores de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto, así como la concentración de cadmio en el agua en el Estuario de Atastillo en la Laguna de Términos, donde fueron capturados los juveniles de *L. setiferus* se señalan en la tabla 2.

Tabla 2. Temperatura, salinidad, oxígeno disuelto (OD), pH y concentración de cadmio en el agua de las zonas de captura de los juveniles de *L. setiferus* (promedio \pm ES). Entre paréntesis se señalan valores máximos y mínimos.

CAPTURA		CADMIO mg/l		SALINIDAD ups	pH	TEMPERATURA °C	O.D. mg/l
		AGUA SIN FILTRAR	AGUA FILTRADA				
LLUVIAS	Septiembre 2000	0.017 \pm 0.006 (0.006-0.028)	0.017 \pm 0.007 (0.005-0.028)	11.0 \pm 1.19 (2 - 15)	7.61 \pm 0.08 (7.2 - 8.5)	27.85 \pm 0.21 (26.3 - 29.1)	4.37 \pm 0.16 (3.5 - 5.3)
	NORTES	Febrero 2001	0.006 \pm 0.0005 (0.005-0.006)	0.0045 \pm 0.001 (0.004-0.005)	5.28 \pm 0.36 (4.3 - 6.6)	7.72 \pm 0.03 (7.61-7.78)	27.9 \pm 0.27 (27.3-29)
SECAS	Mayo 2001	0.063 \pm 0.0015 (0.061-0.064)	0.064 \pm 0.001 (0.063-0.064)	27.66 \pm 0.38 (23.7 - 29.6)	7.88 \pm 0.03 (7.76-8.07)	29.78 \pm 0.25 (28.2 - 31.7)	5.06 \pm 0.28 (3.6 - 6.8)

Los camarones capturados en septiembre del 2000 se utilizaron en los experimentos realizados en 17 ups; mientras que los capturados en febrero y mayo del 2001 se destinaron a los experimentos realizados en 10 ups.

En el laboratorio, durante el periodo de mantenimiento y a lo largo de los bioensayos, no se observó mortalidad en los camarones.

Durante el transcurso de la exposición al cadmio en las dos salinidades experimentales (10 y 17 ups), las concentraciones reales de cadmio total en el medio se mantuvieron constantes, en 0.10 ± 0.004 mg Cd/l y 0.18 ± 0.004 mg Cd/l.

3.1. OSMOREGULACIÓN

3.1.1. Presión osmótica

Los camarones del grupo testigo evaluados en 17 ups mantuvieron su medio interno constante a lo largo de las pruebas, en niveles ligeramente hiperosmóticos (539.5 ± 7.2 mOsm/Kg) con respecto al medio externo (497.7 ± 2.6 mOsm/Kg) (Tabla 3).

La presión osmótica de la hemolinfa de los camarones durante la etapa de exposición a 0.10 mg Cd/l y 0.18 mg Cd/l y durante el periodo de recuperación en un medio exento del metal, se señalan en la tabla 3 y en la figura 4A. La exposición a 0.10 mg Cd/l no modificó la presión osmótica de los camarones manteniéndose constante los valores a lo largo del bioensayo y en niveles similares al grupo testigo ($p > 0.05$). En contraste, la exposición a 0.18 mg Cd/l incrementó significativamente la presión osmótica de los camarones hasta un 13.2 %, a las 24 y 72 h de exposición al metal ($p < 0.05$); no obstante a las 120 h de exposición la presión osmótica recuperó los niveles normales iniciales manteniéndose estable durante toda la etapa de recuperación, en niveles similares al grupo testigo ($p > 0.05$).

Los juveniles de *L. setiferus* evaluados en 10 ups mantuvieron su medio interno hiperosmótico con respecto al medio externo (295.17 ± 2.61 mOsm/Kg). La exposición a 10 mg Cd/l, no modificó la presión osmótica de los camarones; en contraste, al exponer los organismos a 0.18 mg Cd/l la presión osmótica de la hemolinfa se redujo significativamente ($p < 0.05$) a las 24 y 120 h de exposición, con una disminución máxima de 14.9%; no obstante los camarones recuperaron los niveles normales desde las primeras 24 h en un medio libre de metal ($p > 0.05$) (Tabla 3).

El análisis de varianza efectuado demostró que la presión osmótica del medio interno de los camarones no fue alterada por la exposición al cadmio ($p > 0.05$), pero si fue modificada por la salinidad, particularmente en los grupos expuestos en 0.10 mg Cd/l ($p < 0.05$); a su vez la interacción cadmio-salinidad ejerció un efecto significativo ($p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Tabla 3. Presión osmótica de la hemolinfa (mOsm/Kg) de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	P.O. mOsm/Kg	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	P.O. mOsm/Kg	n
17 ¹	Testigo ^{AB1}	EXPOSICIÓN ^{ABa1}	0	525.04 ± 11.77 ^a	6	10 ²	Testigo ^{AB1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	549.99 ± 7.17 ^a	8
			24	551.66 ± 9.69 ^a	5				24	580.72 ± 17.28 ^a	7
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	563.06 ± 8.68 ^a	4				120	555.93 ± 9.12 ^a	8
		24	529.79 ± 21.43 ^a	4	0.10 ^{A1}			24	527.42 ± 12.80 ^a	8	
		168	527.76 ± 9.44 ^a	7				168	568.50 ± 12.25 ^a	7	
	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	525.04 ± 11.77 ^a	6				0	549.99 ± 7.17 ^a	8	
			24	547.22 ± 15.46 ^a	6			24	596.86 ± 16.01 ^a	9	
			72	ND				72	541.34 ± 5.38 ^a	7	
			120	499.69 ± 21.21 ^a	6			120	553.56 ± 13.06 ^a	9	
			24	490.82 ± 21.17 ^a	5	0.18 ^{B1}		24	563.06 ± 10.00 ^a	8	
			72	521.87 ± 19.27 ^a	3			72	561.88 ± 6.59 ^a	8	
			168	552.20 ± 4.83 ^a	7			168	559.26 ± 6.68 ^a	10	
			0	525.04 ± 11.77 ^a	6	MIO EXTERNO		0	549.99 ± 7.17 ^a	8	
			24	603.46 ± 12.50 ^b	4			24	521.87 ± 19.43 ^b	6	
			72	610.59 ± 20.83 ^b	6			72	541.68 ± 8.57 ^a	8	
			120	545.95 ± 17.63 ^a	5			120	477.51 ± 5.49 ^b	4	
			24	535.74 ± 9.41 ^a	8			24	540.25 ± 15.50 ^a	5	
			72	558.31 ± 4.75 ^a	2			72	548.81 ± 7.53 ^a	10	
			168	520.97 ± 16.31 ^a	7		168	546.90 ± 7.37 ^a	10		
		MIO EXTERNO		497.67 ± 2.60				MIO EXTERNO		295.17 ± 2.61	

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

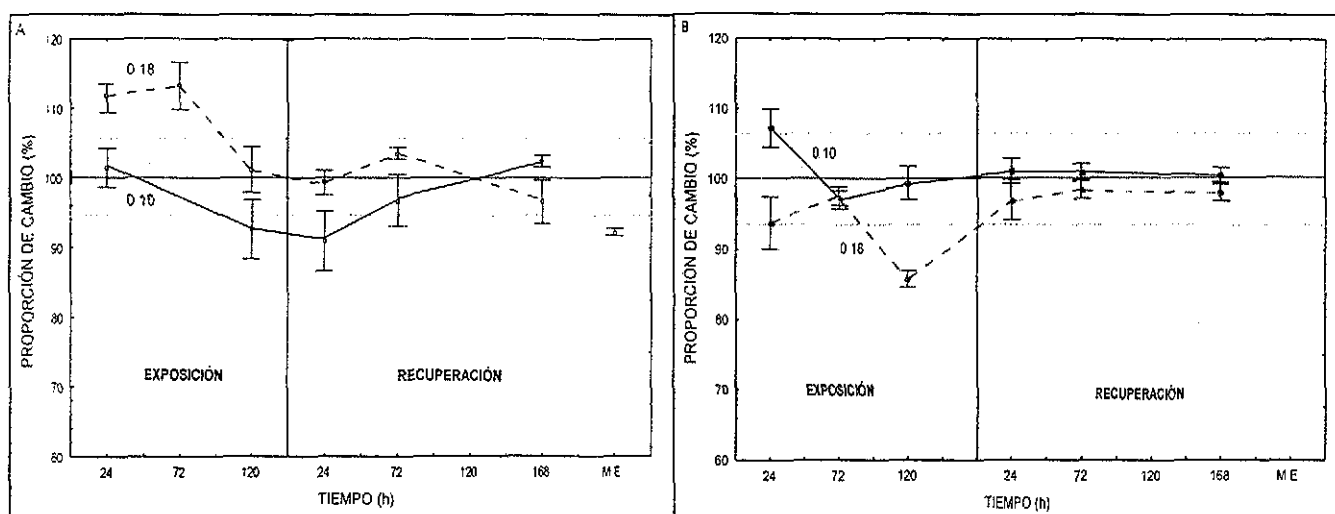


Figura 4. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la presión osmótica de la hemolinfa de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio en dos salinidades: 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

Al comparar los grupos experimentales entre ambas salinidades, la presión osmótica de los grupos testigo fueron similares en los periodos de exposición y recuperación. En los camarones expuestos a 0.10 mg Cd/l en 10 ups, la presión osmótica durante las etapas de exposición y recuperación fue 7% mayor que en los camarones expuestos en 17 ups ($p < 0.05$). En contraste, la presión osmótica de los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l en 10 ups fue 8.5% menor ($p < 0.05$) que en los evaluados en 17 ups; no obstante ambos grupos durante la etapa de recuperación recobraron los valores iniciales en niveles similares al grupo testigo ($p > 0.05$) (Tabla 3).

3.1.2. Iones Plasmáticos Na^+ , K^+ y Cl^-

Los juveniles de *L. setiferus* evaluados en 17 y 10 ups, mantuvieron su medio interno hiper-iónico con respecto al medio externo (Tablas 4, 5 y 6).

En relación al Na^+ , los camarones del grupo testigo evaluados en 17 ups mantuvieron constantes la concentración del ión a lo largo de las pruebas ($p > 0.05$) en niveles 46.7% mayores que el medio externo ($p < 0.05$) (Tabla 4; Figura 5A). En los grupos expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l, los niveles de Na^+ se mantuvieron similares durante las etapas de exposición y recuperación ($p > 0.05$).

Sin embargo, el análisis estadístico demostró que 0.18 mg Cd/l incrementó significativamente los niveles de Na⁺ (5.2%) en el medio interno de los camarones, respecto al grupo testigo (p<0.05) (Tabla 4; Figura 5A).

En 10 ups, los niveles de Na⁺ en la hemolinfa de los camarones del grupo testigo se mantuvieron constantes a lo largo del bioensayo (p>0.05) con valores 104% mayores que el medio externo (p<0.05). De manera general, la exposición al cadmio no modificó la concentración interna del Na⁺ (p>0.05), manteniéndose niveles similares durante las etapas de exposición y recuperación (p>0.05); solamente la exposición de 120 h a 0.18 mg Cd/l redujo 8.2% los niveles del ión (p<0.05) los cuales incrementaron a niveles normales (p>0.05) en un medio libre del metal (Tabla 4; Figura 2B).

El análisis de varianza denotó el efecto significativo de la salinidad y de la interacción salinidad-cadmio (p<0.05), más no así de la exposición al metal (p>0.05). Al comparar los grupos experimentales en ambas salinidades, los niveles de Na⁺ en la hemolinfa de los camarones evaluados en 10 ups, tanto del grupo testigo como los expuestos a ambas concentraciones de cadmio, fueron 24% menores que los grupos respectivos evaluados en 17 ups (Tabla 4).

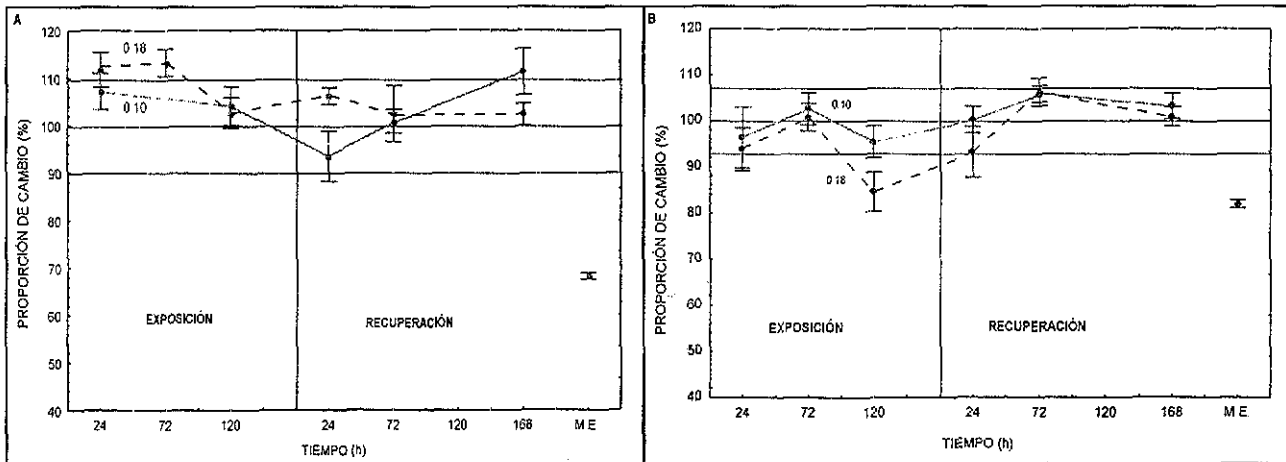


Figura 5. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de Na⁺ de la hemolinfa de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio ± ES; líneas punteadas).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Tabla 4. Niveles de sodio (Na⁺; mMoles/l) en la hemolinfa de los juveniles de *L. seiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	Na ⁺ mMoles/l	N	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	Na ⁺ mMoles/l	n
17 ¹	Testigo A ¹	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	314.51 ± 9.72 ^a	8	Testigo A ²	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	0	269.54 ± 7.87 ^a	7	
			24	318.84 ± 7.40 ^a	6			24	279.56 ± 4.81 ^a	5	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	326.16 ± 16.97 ^a	6		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	120	261.53 ± 3.49 ^a	5	
	0.10 ^{AB1}		24	304.01 ± 12.89 ^a	7	0.10 ^{A2}		24	266.52 ± 10.73 ^a	6	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	343.40 ± 15.56 ^a	5		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	168	263.63 ± 10.67 ^a	5	
			0	314.51 ± 9.72 ^a	8			0	269.54 ± 7.87 ^a	7	
17 ¹	0.10 ^{AB1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	344.61 ± 13.14 ^a	7	0.10 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	24	258.47 ± 17.20 ^a	5	
			72	ND	6			72	274.86 ± 9.60 ^a	6	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	334.62 ± 13.51 ^a	6		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	120	255.77 ± 8.94 ^a	7	
	0.18 ^{B1}		24	300.24 ± 15.83 ^a	7	0.18 ^{A2}		24	268.83 ± 7.79 ^a	7	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	323.93 ± 7.96 ^a	6		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	72	283.45 ± 5.12 ^a	7	
			168	357.90 ± 17.52 ^a	5			168	276.77 ± 7.83 ^a	7	
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	314.51 ± 9.72 ^a	8	0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	0	269.54 ± 7.87 ^a	7	
			24	359.40 ± 13.23 ^a	6			24	251.57 ± 11.65 ^a	6	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	364.01 ± 10.38 ^a	6		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	72	270.22 ± 8.03 ^a	6	
	MEDIO EXTERNO		24	329.85 ± 10.61 ^a	5	MEDIO EXTERNO		24	226.79 ± 9.63 ^b	5	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	341.24 ± 6.15 ^a	7		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	24	249.98 ± 13.70 ^a	6	
			168	329.18 ± 19.45 ^a	6			72	284.81 ± 8.50 ^a	6	
MEDIO EXTERNO				219.07 ± 1.50	12	MEDIO EXTERNO				131.70 ± 1.17	12

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas (p<0.05).
 Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas (p<0.05).
 Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

En relación con los niveles de K^+ en la hemolinfa, los camarones del grupo testigo evaluados en cada salinidad (10 y 17 ups), mantuvieron concentraciones constantes a lo largo de las pruebas ($p>0.05$) e hiperiónicos respecto al medio externo ($p<0.05$), en niveles 128 y 81% mayores en 10 y 17 ups, respectivamente.

En 17 ups, sólo la exposición a 0.18 mg Cd/l modificó la concentración del K^+ en el medio interno de los camarones ($p<0.05$) (Tabla 5; Figura 6A). No obstante, la concentración de K^+ sólo se modificó en las primeras 24 h de exposición, observándose una reducción del 29.6 % respecto a los valores iniciales ($p<0.05$); sin embargo, a partir de las 72 h de exposición se observó una recuperación de los niveles del ión los cuales se mantuvieron constantes hasta el termino del bioensayo en niveles similares al grupo testigo ($p>0.05$). Si bien la exposición de 0.10 mg Cd/l no modificó la concentración iónica del K^+ ($p>0.05$), a las 24 h de recuperación en un medio libre del metal se observó una reducción del 16.6% ($p<0.05$), los cuales se recuperaron a los valores normales iniciales a las 72 h ($p>0.05$). No se observaron diferencias significativas entre las etapas de exposición-recuperación de cada tratamiento ($p>0.05$).

En los camarones evaluados en 10 ups, la exposición al cadmio no modificó significativamente los niveles de K^+ en el medio interno de los camarones ($p>0.05$). Sin embargo, en el grupo expuesto a 0.10 mg Cd/l, se observaron diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación; a partir de las 72 h de recuperación, los niveles de K^+ se incrementaron hasta un 14% ($p<0.05$) manteniéndose elevados hasta el término de las pruebas (Tabla 5; Figura 6B). La exposición a 0.18 mg Cd/l no modificó significativamente los niveles del ión en la hemolinfa de los camarones ($p>0.05$).

El análisis de varianza de dos vías realizado denota el efecto significativo de la salinidad y de la exposición al metal ($p<0.05$) sobre los niveles de K^+ en la hemolinfa de *L. setiferus*, más no así de la interacción de las variables ($p>0.05$).

RESULTADOS

Tabla 5. Niveles de potasio (K⁺; mMoles/l) en la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	K ⁺ mMoles/l	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	K ⁺ mMoles/l	n
17 ¹	Testigo A ¹	EXPOSICIÓN Aa1	0	11.23 ± 0.31 ^a	8	10 ²	Testigo A ²	EXPOSICIÓN Ab2	0	8.63 ± 0.34 ^a	7
			24	12.56 ± 0.26 ^a	6				24	9.85 ± .69 ^a	5
		120	11.99 ± 0.41 ^a	6	RECUPERACIÓN Aa2			120	ND	5	
		24	11.43 ± 0.64 ^a	7				24	8.85 ± 0.33 ^a	6	
		168	11.34 ± 0.45 ^a	5				168	8.67 ± 0.15 ^a	5	
	0.10 A ¹	EXPOSICIÓN Aa1	0	11.23 ± 0.31 ^a	8		0.10 A ²	EXPOSICIÓN Ab2	0	8.62 ± 0.336 ^a	7
			24	12.06 ± 0.43 ^a	7				24	7.99 ± 0.30 ^a	5
		72	ND		RECUPERACIÓN Aa2			72	8.33 ± 0.24 ^a	6	
		120	11.91 ± 0.42 ^a	6				120	8.72 ± 0.20 ^a	7	
		24	9.77 ± 0.40 ^b	7				24	9.18 ± 0.17 ^a	7	
0.18 B ¹	EXPOSICIÓN Aa1	72	10.53 ± 0.64 ^a	6	0.18 A ²	RECUPERACIÓN Ab2	72	10.26 ± 0.20 ^b	7		
		168	12.54 ± 0.72 ^a	5			168	10.01 ± 0.22 ^b	7		
	RECUPERACIÓN Aa1	0	11.23 ± 0.31 ^a	8		EXPOSICIÓN Aba2	0	8.63 ± 0.34 ^a	7		
24		8.26 ± 0.42 ^b	6	24	8.72 ± 0.31 ^a		6				
MEDIO EXTERNO	EXPOSICIÓN Aa1	72	10.87 ± 0.28 ^a	6	MEDIO EXTERNO	RECUPERACIÓN Aa1	72	8.84 ± 0.28 ^a	6		
		120	10.39 ± 0.40 ^a	5			120	9.97 ± 0.49 ^a	5		
	24	11.55 ± 0.66 ^a	7	24		8.95 ± 0.57 ^a	6				
	72	11.01 ± 0.58 ^a	6	72		9.45 ± 0.34 ^a	6				
MEDIO EXTERNO		168		10.26 ± 0.55 ^a	6	MEDIO EXTERNO		168		9.15 ± 0.17 ^a	8
MEDIO EXTERNO				6.45 ± 0.11	12	MEDIO EXTERNO				3.94 ± 0.02	12

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

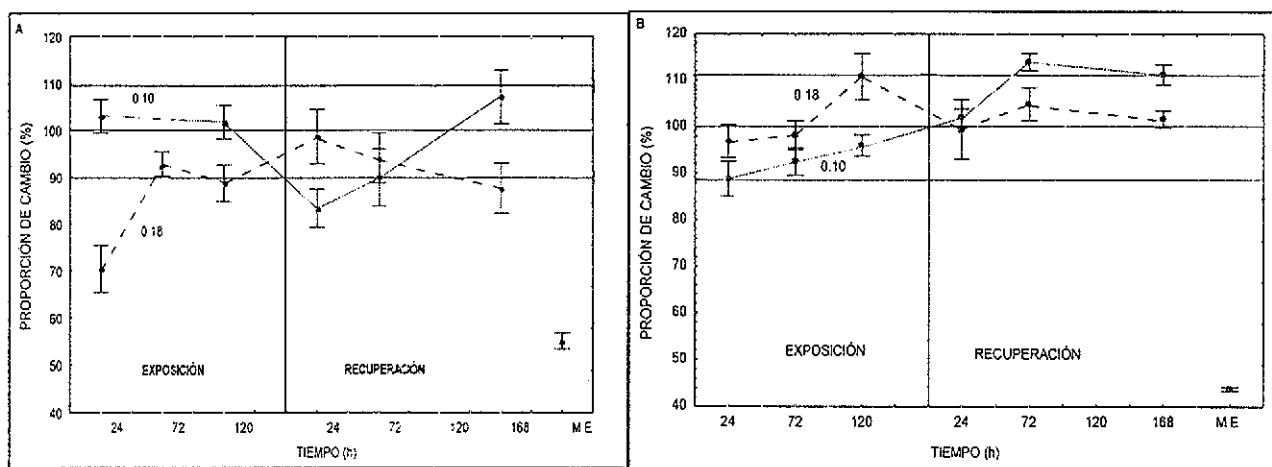


Figura 6. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de K^+ de la hemolinfa de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.08 y durante 0.16 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

El efecto significativo de la salinidad se observó tanto en los grupos testigo como en los expuestos al cadmio ($p < 0.05$). Los niveles de K^+ en la hemolinfa de los camarones del grupo testigo evaluados en 17 ups fueron 30% mayores que en los evaluados en 10 ups; en los grupos expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l en 17 ups, la concentración de K^+ fue 39 y 13 % mayores respectivamente que los grupos evaluados en 10 ups (Tabla 5).

Con relación al Cl^- , los grupos testigo evaluados en 17 y 10 ups mantuvieron niveles hiperiónicos respecto al medio externo, 64 y 65% mayores respectivamente. El análisis estadístico efectuado demostró el efecto significativo del cadmio y de la salinidad ($p < 0.05$), pero no así de su interacción ($p > 0.05$). En 17 ups, la exposición a las dos concentraciones del metal (0.10 y 0.18 mg Cd/l) alteró la concentración del Cl^- en la hemolinfa de los camarones ($p < 0.05$); a su vez se observaron diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación al cadmio ($p < 0.05$) (Tabla 6; Figura 7A).

En los organismos expuestos en 0.10 mgCd/l a las 120 h de exposición los niveles de Cl^- se incrementaron 7% respecto a los valores iniciales ($p < 0.05$) y se redujeron 33.4 % desde las primeras 24 h de recuperación ($p < 0.05$), recuperando sus niveles normales al final de la etapa. En 0.18 mgCd/l el efecto de la exposición al metal fue mayor; a partir de las primeras 24 h se observó una reducción de los niveles de Cl^- en un 35.6% ($p < 0.05$), manteniéndose bajo durante toda la

etapa; no obstante, desde el inicio de la etapa de recuperación los niveles de Cl^- alcanzaron niveles normales, similares al grupo testigo ($p>0.05$) (Tabla 6; Figura 7A).

En los camarones evaluados en 10 ups, sólo la exposición a 0.18 mg Cd/l alteró la concentración de Cl^- de la hemolinfa, observándose diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación ($p<0.05$); a partir de las 24 h de exposición, se observó un decremento del 34.4% que se mantuvo hasta las 24 h de recuperación, a partir del cual los niveles del ión aumentaron hasta alcanzar los valores iniciales similares al grupo testigo ($p>0.05$) (Tabla 6; Figura 7B).

En los camarones expuestos en 0.18 mg Cd/l, la reducción global en la concentración de Cl^- del medio interno durante la etapa de exposición respecto al grupo testigo, fue similar en ambas salinidades. del 19 y 18% en 10 y 17 ups (Tabla 6).

Al comparar los grupos experimentales evaluados en las dos salinidades, tanto en los camarones del grupo testigo como en los expuestos al cadmio en 17 ups, los niveles de Cl^- en la hemolinfa fueron 34 a 40% mayores que los grupos respectivos evaluados en 10 ups ($p<0.05$).

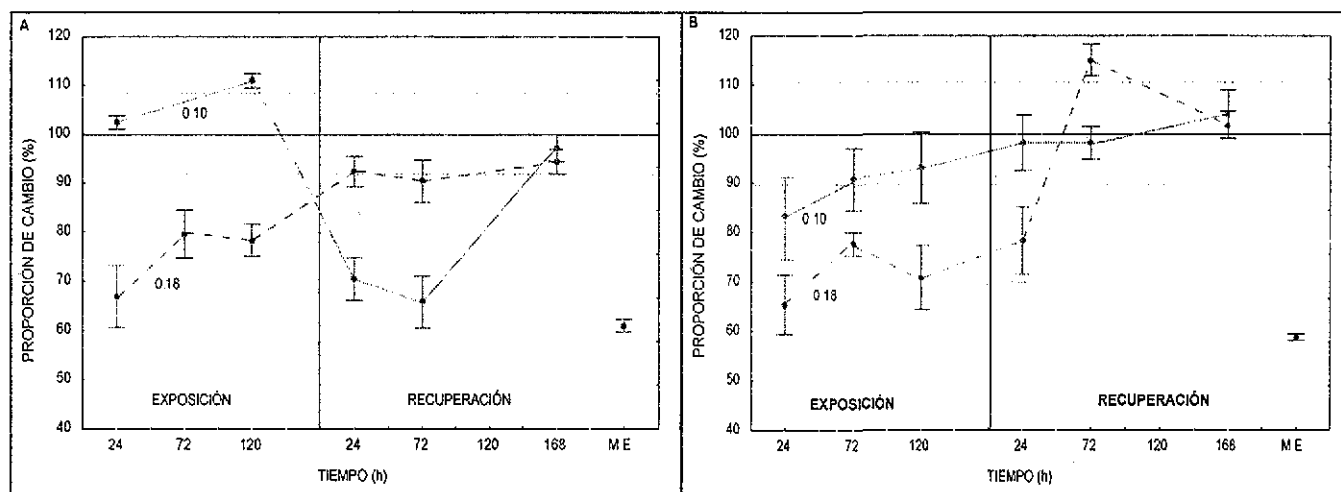


Figura 7. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de Cl^- en la hemolinfa de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.08 y 0.16 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

RESULTADOS

Tabla 6. Niveles de cloro (Cl⁻; mMoles/l) en la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	Cl ⁻ mMoles/l	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	Cl ⁻ mMoles/l	n
17 ¹	Testigo A ¹	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	374.05 ± 10.57 ^a	8	10 ²	Testigo A ²	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	247.05 ± 9.91 ^a	7
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	345.34 ± 7.05 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	233.95 ± 12.95 ^a	5
	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	120	374.36 ± 9.78 ^a	6		0.10 ^{AB2}	RECUPERACIÓN ^{Aa2}	120	208.88 ± 4.19 ^a	5
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	341.37 ± 14.98 ^a	7			EXPOSICIÓN ^{Aa2}	24	259.69 ± 13.25 ^a	6
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	168	362.94 ± 11.68 ^a	5		0.18 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	247.09 ± 11.92 ^a	5
		RECUPERACIÓN ^{Bb1}	0	374.05 ± 10.57 ^a	8			EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	247.05 ± 9.91 ^a	7
17 ¹	Testigo A ¹	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	368.44 ± 5.13 ^a	7	10 ²	Testigo A ²	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	24	205.62 ± 18.26 ^a	5
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	ND	6			RECUPERACIÓN ^{Aa2}	72	224.13 ± 14.10 ^a	6
	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	120	398.93 ± 5.88 ^b	6		0.10 ^{AB2}	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	120	229.82 ± 16.62 ^a	7
		RECUPERACIÓN ^{Bb1}	24	249.01 ± 10.98 ^b	7			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	242.67 ± 13.63 ^a	7
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	72	236.41 ± 12.53 ^b	6		0.18 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	242.53 ± 8.18 ^a	7
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	349.80 ± 9.65 ^a	5			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	168	256.82 ± 12.81 ^a	7
0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	374.05 ± 10.57 ^a	8	0.18 ^{B2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	0	247.05 ± 9.91 ^a	7		
	RECUPERACIÓN ^{Ab1}	24	240.71 ± 15.26 ^b	6		RECUPERACIÓN ^{Ab1}	24	161.41 ± 9.64 ^b	6		
0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	286.17 ± 13.96 ^b	6	0.18 ^{B2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	191.59 ± 4.56 ^b	6		
	RECUPERACIÓN ^{Ab1}	120	281.61 ± 9.27 ^b	5		RECUPERACIÓN ^{Ab1}	120	174.81 ± 11.32 ^b	5		
0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	332.10 ± 10.25 ^a	7	0.18 ^{B2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	193.50 ± 13.14 ^b	6		
	RECUPERACIÓN ^{Ab1}	72	324.76 ± 14.26 ^a	6		RECUPERACIÓN ^{Ab1}	72	284.09 ± 9.13 ^a	6		
MEDIO EXTERNO			219.40 ± 2.83	12	MEDIO EXTERNO				145.13 ± 0.99	12	

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas (p<0.05).
 Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas (p<0.05).
 Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

3.1.3. Proteína total en hemolinfa.

El análisis de varianza efectuado denotó el efecto significativo de la salinidad, de la exposición al cadmio y de la interacción de ambos factores ($p < 0.05$) en los niveles de proteína total en la hemolinfa de los organismos (Tabla 7).

Si bien, en 17 ups el análisis estadístico no demostró de manera general el efecto significativo del cadmio, la exposición a 0.10 mg Cd/l, el nivel de proteína total en hemolinfa a las 120 h de exposición aumentó 69.4% ($p < 0.05$) respecto a los niveles iniciales, manteniéndose elevado en las primeras 24 h de la etapa de recuperación; a partir de las 72 h de recuperación, la concentración de proteína total se redujo hasta alcanzar sus valores normales similares al grupo testigo ($p > 0.05$) los cuales se mantuvieron hasta el término del periodo de recuperación (Tabla 7; Figura 8A).

Asimismo, la exposición a 0.18 mg Cd/l modificó la concentración de proteína total, observándose diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación ($p < 0.05$); a partir de las 72 h de exposición, la concentración de proteína total aumentó significativamente ($p < 0.05$) hasta un 56.9%; no obstante, al inicio del periodo de recuperación recobró los valores normales iniciales, similares al grupo testigo ($p > 0.05$) (Tabla 7; Figura 8A).

En los camarones evaluados en 10 ups, el contenido de proteína total en hemolinfa fue modificado por la exposición a 0.10 y 0.18 mg Cd/l no obstante se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las etapas de exposición y recuperación sólo en el grupo expuesto a 0.18 mg Cd/l (Tabla 7; Figura 8A).

En 0.10 mg Cd/l, los niveles de proteínas se incrementaron 48 y 36.8% a las 24 y 120 h de exposición al metal ($p < 0.05$), mientras que en 0.18 mg Cd/l se observó un incremento del 107% a las 72 h de exposición ($p < 0.05$) respecto a los valores iniciales (Figura 8B). No obstante, durante la etapa de recuperación, la concentración de proteína total recobró los niveles iniciales, similares al grupo testigo ($p > 0.05$) (Tabla 7; Figura 8B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Tabla 7. Proteína total en la hemolinfa (mg/ml) de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	PROTEÍNA mg/ml	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	PROTEÍNA mg/ml	n
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	74.67 ± 3.89 ^a	9	10 ²	Testigo ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	66.47 ± 5.14 ^a	8
		EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	80.99 ± 4.86 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	66.62 ± 6.01 ^a	9
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	92.84 ± 7.92 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	67.02 ± 3.58 ^a	6
	0.10 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	85.18 ± 2.31 ^a	7		0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	67.13 ± 8.51 ^a	6
		EXPOSICIÓN ^{ABa1}	72	ND	5			EXPOSICIÓN ^{Aa1}	72	67.43 ± 3.84 ^a	5
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	142.30 ± 6.22 ^b	3			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	66.47 ± 5.14 ^a	8
0.18 ^{A1}	0.10 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	116.91 ± 6.19 ^b	9	0.18 ^{B1}	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	98.33 ± 4.45 ^b	9
		EXPOSICIÓN ^{Aa1}	72	72.47 ± 5.70 ^a	7			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	86.92 ± 2.02 ^a	9
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	86.02 ± 5.44 ^a	8			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	90.95 ± 3.37 ^a	10
	0.18 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	74.67 ± 3.89 ^a	9		0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	95.31 ± 3.71 ^b	8
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	91.54 ± 16.12 ^a	3			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	77.24 ± 4.72 ^a	10
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	131.73 ± 7.75 ^b	8			RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	66.61 ± 3.43 ^a	9
0.18 ^{A1}	0.18 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Ab1}	120	103.99 ± 9.14 ^b	6	0.18 ^{B1}	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ab1}	120	142.14 ± 12.72 ^b	5
		EXPOSICIÓN ^{Ab1}	24	75.05 ± 3.08 ^a	8			EXPOSICIÓN ^{Ab1}	24	70.65 ± 4.69 ^a	8
		RECUPERACIÓN ^{Ab1}	72	91.21 ± 3.51 ^a	6			RECUPERACIÓN ^{Ab1}	72	85.03 ± 4.91 ^a	9
			168	62.39 ± 2.91 ^a	8				168	69.03 ± 2.25 ^a	9

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

El efecto significativo por el cambio de salinidad se observó fundamentalmente en los camarones del grupo testigo ($p < 0.05$); en los grupos evaluados en 17 ups la concentración de proteína total en la hemolinfa fue 25.4% mayor que los evaluados en 10 ups. En los camarones expuestos a 0.10 mg Cd/l en 17 ups el incremento observado en los niveles de proteína total fue de 19.4% respecto a 10 ups ($p > 0.05$) mientras que en la exposición a 0.18 mg Cd/l, los niveles de proteína total fueron similares en ambas salinidades ($p > 0.05$) (Tabla 7; Figuras 8A y 8B).

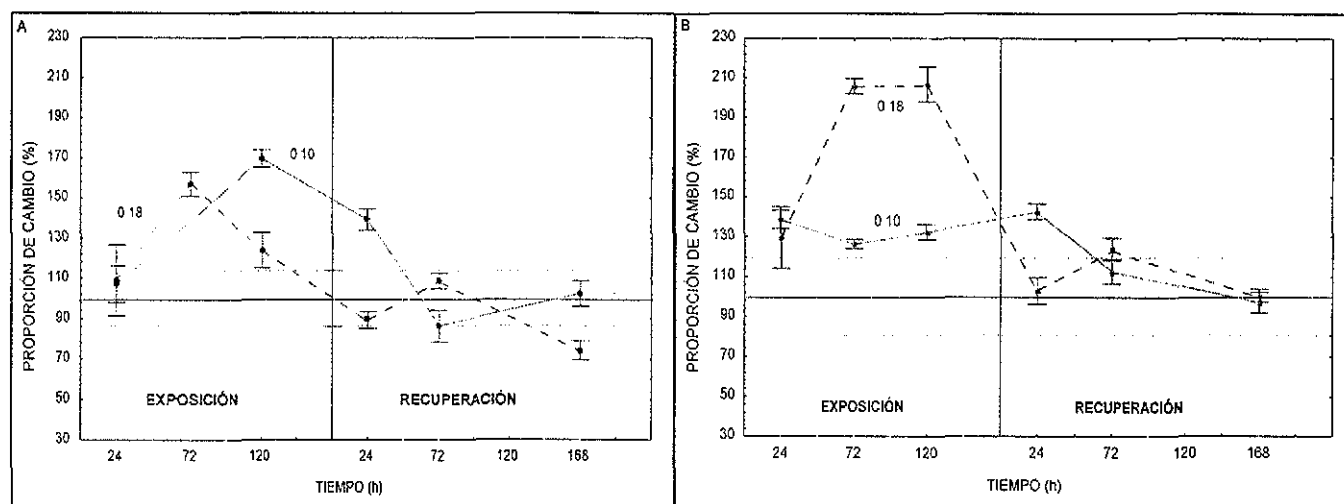


Figura 8. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) del contenido de proteína total en la hemolinfa de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

3.1.4 Actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa en branquia.

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática de las ATPasas Total y la Mg^+ ATPasa en las branquias de los camarones de los grupos experimentales y a partir de los cuales se calculó la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, se incluyen en el Anexo II (Tablas 1 y 2; Figuras 1 y 2). Cabe señalar que tanto la salinidad, la exposición al cadmio y la interacción de estos dos factores, modificaron significativamente ($p < 0.05$) las actividades enzimáticas de las ATPasas Total, la Mg^+ ATPasa y la Na^+/K^+ -ATPasa (Tabla 8).

En los camarones evaluados en 17 ups la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa presentó cambios significativos ($p < 0.05$) por la exposición a 0.10 y 0.18 mg Cd/l ($p < 0.05$), observándose la inhibición de la actividad enzimática desde las 24 h de exposición, con reducciones del 17.9% en 0.10 mg Cd/l a 37.7% en 0.18 mg Cd/l ($p < 0.05$). Durante el periodo de recuperación la actividad enzimática sólo en 0.10 mg Cd/l recobró los valores iniciales hasta el séptimo día (168 h) y en niveles similares al grupo testigo ($p > 0.05$); no se observó una recuperación a la exposición a 0.18 mg Cd/l, manteniéndose la actividad enzimática inhibida respecto a los valores iniciales, hasta el término del ensayo (Tabla 8; Figura 9A).

En una salinidad de 10 ups, la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial presentó cambios significativos en los diferentes tratamientos al metal ($p < 0.05$). La exposición a 0.10 y 0.18 mg Cd/l inhibió la actividad enzimática a partir de las 120 h y 72 h respectivamente, con reducciones del 41.2% (0.10 mg Cd/l) y del 51.7% (0.18 mg Cd/l) a las 120 h respecto a los valores iniciales ($p < 0.05$) (Tabla 8). No obstante en un medio libre del metal, los camarones expuestos previamente a 0.10 mg Cd/l recuperaron la actividad enzimática a las 72 h ($p > 0.05$), mientras que en los expuestos a 0.18 mg Cd/l la actividad enzimática se recuperó hasta las 168 h, en niveles similares al grupo testigo ($p > 0.05$) (Tabla 8; Figura 9B).

El efecto significativo de la salinidad se observó en los grupos testigo y en los expuestos al metal ($p < 0.05$). En los camarones del grupo testigo evaluados en 10 ups, la actividad de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa branquial fue 111.3% más elevada que en 17 ups ($p < 0.05$). En los grupos expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l en 10 ups, la actividad enzimática fue 68.8% y 93.2% respectivamente mayor que los evaluados en 17 ups ($p < 0.05$) (Tabla 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Tabla 8. Actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa (μMol Pi/mg proteína/h) en branquia de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	Na ⁺ -K ⁺ /ATPasa μMol Pi/mg proteína/h	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	Na ⁺ -K ⁺ /ATPasa μMol Pi/mg proteína/h	n
	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	6.142 ± 0.169 ^a	3	10 ²	Testigo ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	0	12.15 ± 2.24 ^a	2
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	6.418 ± 0.002 ^a	2			EXPOSICIÓN ^{Aa2}	24	12.86 ± 1.08 ^a	4
	RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	5.120 ± 0.432 ^a	4	0.10 ^{B2}		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	120	14.66 ± 0.15 ^a	3	
		24	ND	4			RECUPERACIÓN ^{Bb2}	24	14.02 ± 0.94 ^a	4	
17 ¹	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	6.142 ± 0.169 ^a	3	10 ²	0.18 ^{B2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	0	12.15 ± 2.24 ^a	2
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	5.170 ± 0.270 ^b	5			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	8.22 ± 0.28 ^a	6
	RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	5.105 ± 0.270 ^b	5	0.18 ^{B2}		RECUPERACIÓN ^{Bb2}	72	8.71 ± 0.45 ^a	4	
		120	5.040 ± 0.132 ^b	4			RECUPERACIÓN ^{Ca2}	120	7.15 ± 0.23 ^b	5	
0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	5.427 ± 0.383 ^b	3	10 ²	0.18 ^{B2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	8.45 ± 0.60 ^b	4	
		72	4.810 ± 0.359 ^b	4			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	13.16 ± 1.74 ^a	2	
	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	7.056 ± 0.004 ^a	3		0.18 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{Ca2}	168	10.96 ± 0.44 ^a	5	
		0	6.142 ± 0.169 ^a	3			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	0	12.15 ± 2.24 ^a	2	
	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	4.322 ± 0.458 ^b	5	10 ²	0.18 ^{B2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	9.97 ± 0.59 ^a	3	
		72	4.356 ± 0.286 ^b	4			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	8.04 ± 0.46 ^b	4	
	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	120	3.825 ± 0.213 ^b	4		0.18 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{Ca2}	120	5.87 ± 0.68 ^b	3	
		24	3.073 ± 0.207 ^b	4			RECUPERACIÓN ^{Ca2}	24	6.06 ± 0.74 ^b	2	
	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	3.268 ± 0.383 ^b	3	0.18 ^{B2}	0.18 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{Ca2}	72	7.94 ± 0.46 ^b	6	
		168	3.556 ± 0.181 ^b	3			RECUPERACIÓN ^{Ca2}	168	11.25 ± 0.75 ^a	4	

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

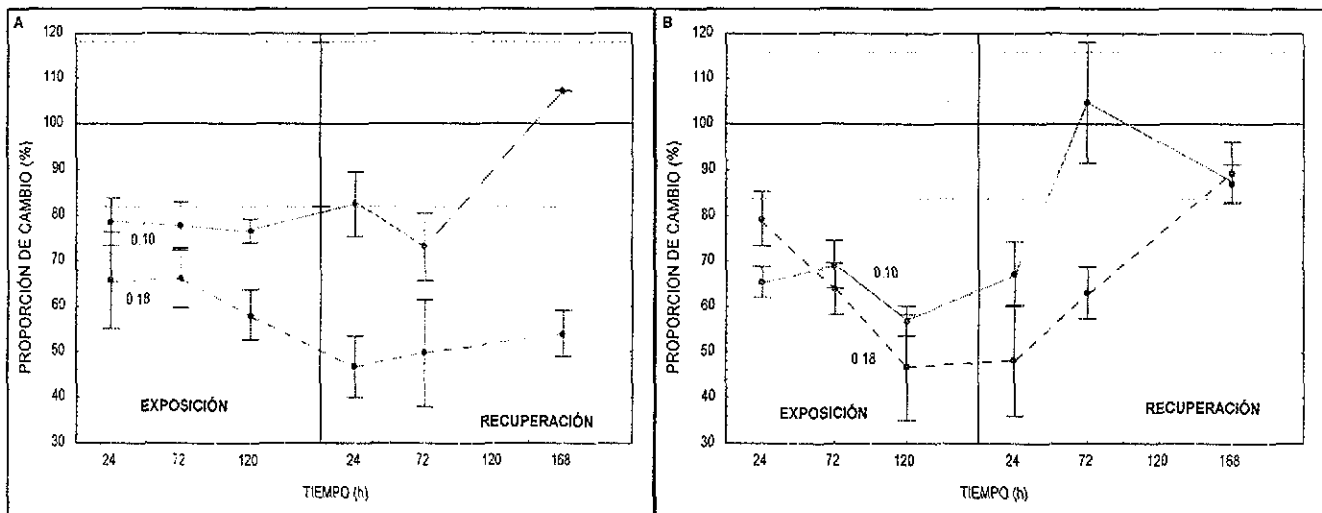


Figura 9. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en branquia de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

3.1.5 Contenido de agua corporal

De manera global, el porcentaje de agua corporal de los camarones evaluados en 17 y 10 ups y expuestos al cadmio, no fue modificado por la salinidad, por el metal o por la interacción de ambos ($p > 0.05$); así mismo, no se observaron diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación en cada concentración ni entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Tabla 9; Figuras 10A y 10B).

Sin embargo, en los camarones del grupo testigo evaluados en 10 ups se observó una hidratación significativa del 1.8% respecto a los evaluados en 17 ups ($p < 0.05$) (Tabla 9). Así mismo, en 10 ups se observó una deshidratación significativa respecto al grupo testigo en los camarones expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l del 2.3 y 1.3% respectivamente ($p < 0.05$). En 0.18 mg Cd/l el análisis estadístico sólo mostró diferencias significativas con respecto a los valores iniciales del grupo testigo a las 168 h de recuperación, periodo en el que se observó una deshidratación del 8% en los organismos ($p < 0.05$) (Figura 10B; Tabla 9).

RESULTADOS

Tabla 9. Porcentaje de agua corporal de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	% AGUA CORPORAL	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	% AGUA CORPORAL	n	
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{A1}	0	77.33 ± 0.49 ^a	4	10 ¹	Testigo ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	77.12 ± 1.26 ^a	4	
		RECUPERACIÓN ^{A1}	24	75.69 ± 0.64 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	ND	3	
	0.10 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	120	76.94 ± 0.36 ^a	5		0.10 ^{Bc1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	120	78.12 ± 1.6 ^a	3	
		RECUPERACIÓN ^{A1}	24	76.76 ± 0.56 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	75.65 ± 0.16 ^a	3	
	0.18	EXPOSICIÓN	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	168	75.56 ± 0.47 ^a		4	0.18 ^C	EXPOSICIÓN ^{Aa}	168	80.50 ± 0.33 ^a	5
			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	0	77.33 ± 0.49 ^a		4			RECUPERACIÓN ^{Aa}	168	77.12 ± 1.26 ^a
17 ¹	0.10 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	75.99 ± 0.47 ^a	4	10 ¹	0.10 ^{Bc1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	75.19 ± 0.28 ^a	5	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	77.0 ± 0.34 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	75.43 ± 0.25 ^a	5	
	0.18	EXPOSICIÓN	120	76.52 ± 0.29 ^a	5		0.18 ^C	EXPOSICIÓN ^{Aa}	120	75.54 ± 0.65 ^a	5	
		RECUPERACIÓN	24	76.04 ± 0.21 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{Aa}	24	75.78 ± 0.39 ^a	5	
	0.18	EXPOSICIÓN	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	72	76.43 ± 0.51 ^a		4	0.18 ^C	EXPOSICIÓN ^{Aa}	72	75.71 ± 0.29 ^a	5
			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	76.60 ± 0.55 ^a		5			RECUPERACIÓN ^{Aa}	168	77.25 ± 0.61 ^a
0.18	EXPOSICIÓN	EXPOSICIÓN	0	ND		0.18 ^C	EXPOSICIÓN ^{Aa}	0	77.12 ± 1.26 ^a	4		
		RECUPERACIÓN	24	ND				RECUPERACIÓN ^{Aa}	24	77.68 ± 0.52 ^a	3	
0.18	EXPOSICIÓN	EXPOSICIÓN	72	ND		0.18 ^C	EXPOSICIÓN ^{Aa}	72	79.40 ± 0.59 ^a	2		
		RECUPERACIÓN	120	ND				RECUPERACIÓN ^{Aa}	120	ND	5	
0.18	EXPOSICIÓN	EXPOSICIÓN	24	ND		0.18 ^C	EXPOSICIÓN ^{Aa}	24	78.53 ± 1.05 ^a	5		
		RECUPERACIÓN	72	ND				RECUPERACIÓN ^{Aa}	72	77.18 ± 1.04 ^a	5	
0.18	EXPOSICIÓN	EXPOSICIÓN	168	ND		0.18 ^C	EXPOSICIÓN ^{Aa}	168	70.87 ± 2.18 ^b	5		
		RECUPERACIÓN	0	ND				RECUPERACIÓN ^{Aa}	0	ND	5	

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas (p<0.05).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

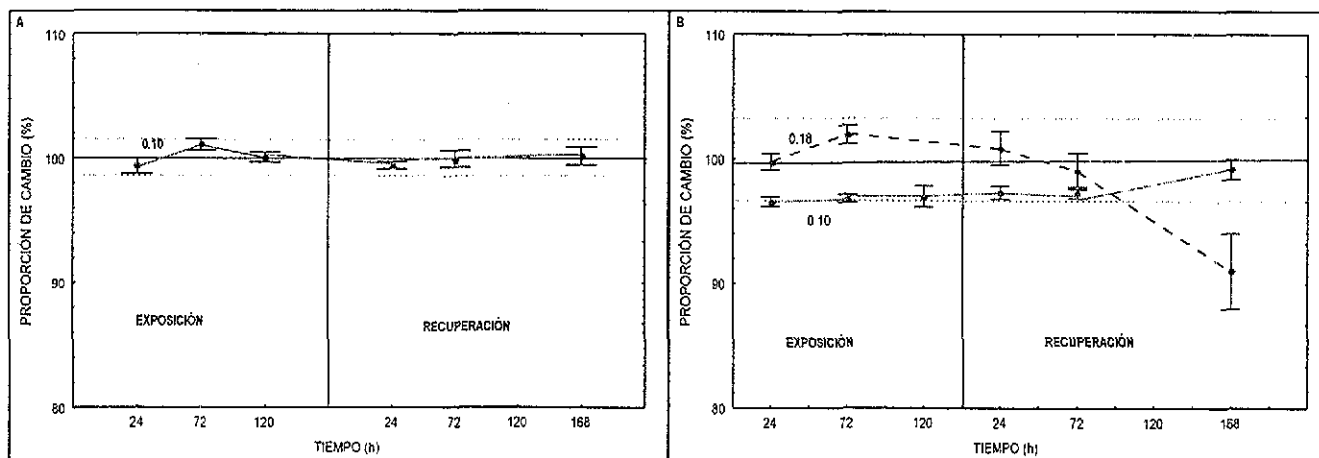


Figura 10. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) del contenido de agua corporal de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas)

3.1.6. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno peso específico ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$) de los juveniles de *L. setiferus* presentó cambios significativos por efecto de la salinidad, de la exposición al cadmio y de la interacción entre ambos factores ($p < 0.05$). En todas las condiciones experimentales no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las etapas de recuperación y exposición (Tabla 10).

En los camarones evaluados en 17 ups, el consumo de oxígeno fue alterado solo por la exposición a 0.18 mg Cd/l ($p < 0.05$); la tasa metabólica se incrementó a partir de las primeras 24h de exposición hasta un máximo de 204.3% a las 120 h, manteniéndose elevada durante la etapa de recuperación sin recobrar el nivel normal inicial ($p < 0.05$) (Tabla 10, Figura 11A).

En contraste, en los camarones evaluados en 10 ups, de manera general la exposición al cadmio no ejerció un efecto significativo en la tasa metabólica de los camarones ($p < 0.05$). Sólo en 0.10 mg Cd/l, la exposición de 24 h incrementó el consumo de oxígeno en 17.8% respecto a la tasa inicial ($p < 0.05$), recobrando valores normales y similares a los del grupo testigo ($p > 0.05$) a partir

de las 72 h de exposición y manteniéndolos durante la etapa de recuperación (Tabla 10; Figura 11B).

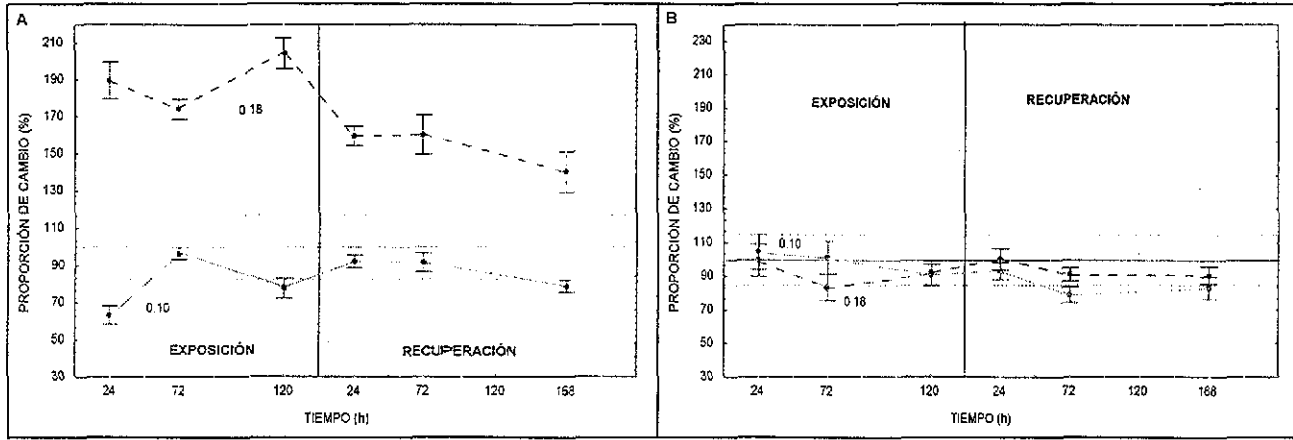


Figura 11. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) del consumo de oxígeno peso específico en *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

El efecto significativo de la salinidad se observó en todos los grupos experimentales. En los camarones del grupo testigo, la tasa metabólica en 10 ups fue 26.7% mayor que la de los evaluados en 17 ups ($p < 0.05$). En los camarones expuestos a 0.10 mg Cd/l en 10 ups el consumo de oxígeno fué 34% mayor que los evaluados en 17 ups ($p < 0.05$). En contraste, en el grupo expuesto a 0.18 mg Cd/l en 17 ups la tasa metabólica fue 46.3% mayor que el evaluado en 10 ups ($p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Tabla 10. Consumo de oxígeno peso específico ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$) de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	QO2 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	QO2 $\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ PH}$	n
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	0.69 ± 0.08 ^a	6	10 ⁻²	Testigo ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	0	1.01 ± 0.07 ^a	7
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	0.99 ± 0.05 ^a	6			RECUPERACIÓN ^{Aa2}	24	1.12 ± 0.07 ^a	6
	0.10 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	120	0.94 ± 0.05 ^a	9		0.10 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Aa2}	120	1.13 ± 0.09 ^a	6
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	1.07 ± 0.07 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Aa2}	24	1.29 ± 0.09 ^b	6
17 ¹	0.10 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	168	0.81 ± 0.06 ^a	7	10 ⁻²	0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Aa2}	168	1.13 ± 0.07 ^a	6
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	0	0.69 ± 0.08 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Aa2}	0	1.01 ± 0.07 ^a	7
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	0.60 ± 0.03 ^a	7		0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	1.19 ± 0.12 ^b	8
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	0.92 ± 0.03 ^a	9			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	1.15 ± 0.11 ^a	7
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	0.74 ± 0.04 ^a	9	10 ⁻²	0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	120	1.03 ± 0.07 ^a	9
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	0.88 ± 0.03 ^a	5			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	1.06 ± 0.06 ^a	10
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	0.88 ± 0.04 ^a	9		0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	0.90 ± 0.06 ^a	9
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	0.75 ± 0.03 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	168	0.98 ± 0.99 ^a	7
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	0.69 ± 0.08 ^a	6	10 ⁻²	0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	0	1.01 ± 0.07 ^a	7
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	1.81 ± 0.18 ^b	6			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	1.13 ± 0.11 ^a	7
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	1.66 ± 0.09 ^b	6		0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	72	0.95 ± 0.09 ^a	8
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	120	2.10 ± 0.17 ^b	6			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	120	1.05 ± 0.08 ^a	7
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	1.52 ± 0.08 ^b	8	0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	24	1.14 ± 0.07 ^a	6	
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	1.53 ± 0.16 ^b	6		EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	1.04 ± 0.05 ^a	10	
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	1.44 ± 0.16 ^b	6	0.18 ^{A2}	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	168	1.03 ± 0.06 ^a	7	

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).
 Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).
 Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y pos etapas.

3.2. Bioacumulación de cadmio

Con el fin de determinar el porcentaje de recuperación del metal de acuerdo al procedimiento utilizado para la cuantificación del cadmio en los tejidos de los camarones analizados, se evaluó bajo las mismas condiciones el hepatopáncreas de *Homarus americanus* (TORT-2; NRC Canadá) como tejido de referencia, obteniéndose una exactitud del método del 91.8% con un coeficiente de variación del 5.3% (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación del contenido de cadmio en hepatopáncreas de *Homarus americanus* (TORT-2) contra el valor medido por espectrometría de absorción atómica. Se incluyen valores promedio y error estándar.

	VALOR REFERENCIA mg Cd/g P.S.	VALOR MEDIDO mg Cd/g P.S	% RECUPERADO	n
TORT-2	0.0267 ± 0.0018	0.0245 ± 0.0013	91.76	7

3.2.1. Acumulación en branquia

En los camarones del grupo testigo evaluados en 17 y 10 ups, los niveles base de cadmio en el tejido branquial fueron similares ($p > 0.05$) y se mantuvieron en un intervalo de 23.75 a 76.46 $\mu\text{g Cd/g PS}$ a lo largo del ensayo. Tanto la exposición subletal al cadmio como su interacción con la salinidad del medio afectó significativamente la concentración del metal en las branquias de los camarones ($p < 0.05$); en contraste, la salinidad no ejerció ningún efecto ($p > 0.05$).

En los camarones evaluados en 17 ups la exposición al cadmio incrementó significativamente la concentración del metal en el tejido branquial a medida que aumentaron los niveles de cadmio en el medio ($p < 0.05$); en cada concentración experimental se observaron diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación ($p < 0.05$). Durante la etapa de exposición a 0.10 y 0.18 mg Cd/l, la acumulación significativa del cadmio en la branquia se observó a las 120 h y a las 24 h de exposición respectivamente ($p < 0.05$), con incrementos de 7.2 y 6.4 veces mayores respecto a los valores base iniciales. Los niveles del metal acumulado en las branquias de los camarones se mantuvieron elevados durante el periodo de recuperación, no observándose una disminución significativa ($p < 0.05$) al final de la etapa (Tabla 12; Figura 12A).

RESULTADOS

Tabla 12. Concentración de cadmio en la branquia de los juveniles de *L. setiferus* ($\mu\text{g/g PS}$) evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	BRANQUIA $\mu\text{g Cd/g PS}$	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	BRANQUIA $\mu\text{g Cd/g PS}$	n	
	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{ABa1}	0	23.75 ± 4.01 ^a	6		Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{ABa1}	0	28.56 ± 2.51 ^a	6	
			24	46.93 ± 8.43 ^a	6				24	74.48 ± 12.18 ^a	6	
			120	76.46 ± 15.26 ^a	6				72	145.46 ± 29.82 ^a	6	
		0.10 ^{B1}	RECUPERACIÓN ^{ABa1}	24	69.81 ± 5.95 ^a		5	0.10 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{ABa1}	24	36.79 ± 8.52 ^a	4
				168	54.02 ± 9.04 ^a		6			120	289.84 ± 53.57 ^b	4
										24	223.11 ± 45.22 ^b	6
17 ¹	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{BBa1}	0	23.75 ± 4.01 ^a	6	10 ¹	0.18 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{BBa1}	0	246.56 ± 24.04 ^b	4	
			24	152.01 ± 20.70 ^b	5				24	254.63 ± 26.31 ^b	5	
			72	161.41 ± 16.13 ^b	4				72	246.56 ± 24.04 ^b	4	
		0.18 ^{C1}	RECUPERACIÓN ^{CBa1}	120	332.31 ± 11.73 ^b		4	0.18 ^{B2}	RECUPERACIÓN ^{BBa2}	120	309.47 ± 24.27 ^b	4
				24	387.17 ± 27.41 ^b		4			24	333.87 ± 79.30 ^b	4
				72	372.81 ± 14.69 ^b		4			72	293.76 ± 28.78 ^b	4
			168	355.95 ± 64.64 ^b	4			168	253.38 ± 63.12 ^b	4		

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).
 Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).
 Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La exposición al cadmio en 10 ups determinó una mayor acumulación del metal en las branquias de los camarones ($p < 0.05$); no obstante ésta fue similar en ambas concentraciones de cadmio ($p > 0.05$), observándose diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación ($p < 0.05$).

En los camarones expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l, la acumulación del metal se observó a partir de las 120 h y 72 h de exposición respectivamente, con incrementos de 10 y 10.5 veces respecto a los niveles base iniciales ($p < 0.05$). Durante la etapa de recuperación, no se observó una disminución significativa ($p > 0.05$) del metal acumulado en branquia (Tabla 12; Figura 12B).

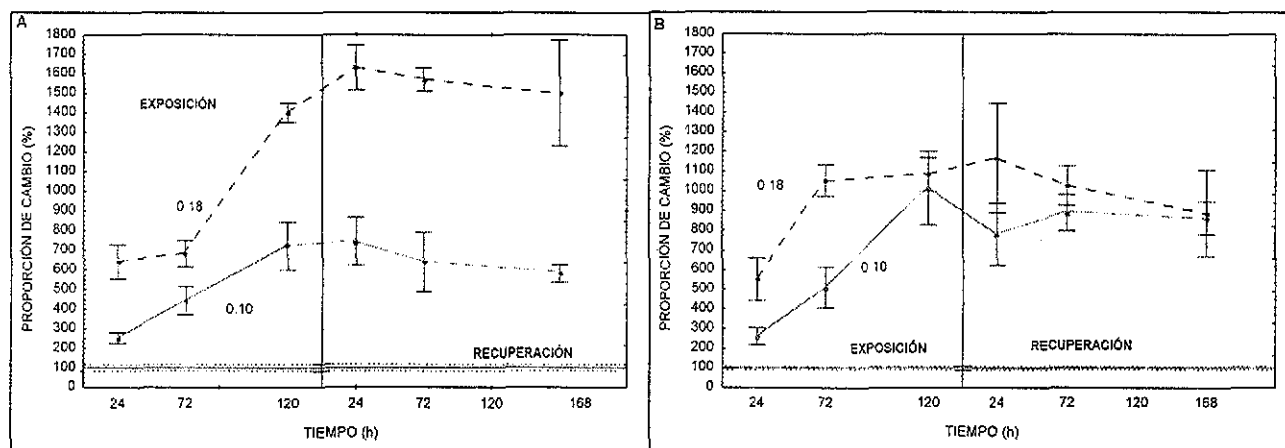


Figura 12. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la acumulación de cadmio en branquia de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

El efecto significativo de la salinidad se observó en los grupos expuestos al cadmio. En 10 ups, la acumulación del metal en la branquia de los camarones expuestos en 0.10 mg Cd/l fue 1.6 veces mayor que los evaluados en 17 ups ($p < 0.05$); en contraste, la exposición a 0.18 mg Cd/l incrementó la acumulación del metal en 1.3 veces en 17 ups respecto a 10 ups ($p < 0.05$). La tasa de acumulación del cadmio en branquia en los organismos expuestos a 0.18 mg Cd/l fue similar en 17 y 10 ups; en contraste, en 10 ups está fue mayor en 0.10 mg Cd/l (Anexo III).

3.2.2. Acumulación en hepatopáncreas

Los niveles base del cadmio en el hepatopáncreas de los camarones de los grupos testigo evaluados en 17 y 10 ups fueron similares ($p>0.05$) y se mantuvieron en un intervalo de 6.42 a 29.26 $\mu\text{g Cd/g PS}$ (Tabla 13).

El análisis estadístico demostró el efecto significativo de la exposición al cadmio en la acumulación del metal en el hepatopáncreas de los organismos ($p<0.05$). No se observó un efecto significativo de la salinidad ni de su interacción con el metal ($p>0.05$). En los camarones evaluados en ambas salinidades y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l, la acumulación del cadmio en el hepatopáncreas se incrementó conforme aumentó la concentración del metal en el medio ($p<0.05$). no obstante, sólo en los camarones evaluados en 10 ups se observaron diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación en 0.10 mg Cd/l ($p<0.05$) (Tabla 13).

En 17 ups, la acumulación significativa en el hepatopáncreas por la exposición a 0.10 mg Cd/l se observó hasta las 120 h de exposición, con incrementos de 27.5 veces respecto a los niveles base iniciales; sin embargo, durante el periodo de recuperación, se observó una rápida tasa de disminución en la concentración del metal acumulado alcanzando niveles normales del grupo testigo a las 72 h en un medio libre del metal ($p>0.05$), a pesar de ser 11.9 veces mayores a los niveles base iniciales (Tabla 13; Figura 13A). En contraste, en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l, la acumulación significativa del metal se observó a partir de las 72 h de exposición, alcanzando niveles máximos de 57.9 veces mayores que los valores base iniciales a las 120 h de exposición; durante la etapa de recuperación, la acumulación del metal se redujo significativamente pero se mantuvo al término de la etapa 13.5 veces mayores que los valores base iniciales ($p>0.05$) (Tabla 13; Figura 13A).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Tabla 13. Concentración de cadmio en el hepatopáncreas de los juveniles de *L. setiferus* ($\mu\text{g/g PS}$) evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	HEPATOPANCREAS $\mu\text{g/g PS}$	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	HEPATOPANCREAS $\mu\text{g/g PS}$	n
17 ¹	Testigo A ¹	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	8.15 ± 0.37 ^a	6	10 ¹	Testigo A ¹	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	6.42 ± 0.48 ^a	6
		EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	8.95 ± 1.04 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	8.87 ± 1.08 ^a	6
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	29.26 ± 2.35 ^a	6			RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	12.12 ± 2.82 ^a	6
	EXPOSICIÓN ^{ABa1}	24	11.90 ± 0.85 ^a	6	0.10 ^{B1}		EXPOSICIÓN ^{ABa1}	24	11.80 ± 12.34 ^a	6	
	EXPOSICIÓN ^{ABa1}	72	8.02 ± 0.75 ^b	6				EXPOSICIÓN ^{ABa1}	72	10.33 ± 0.66 ^a	6
	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	8.15 ± 0.37 ^b	6				RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	6.42 ± 0.48 ^a	6
17 ¹	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	21.36 ± 4.34 ^a	6	10 ¹	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	42.97 ± 15.72 ^a	6
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	86.65 ± 18.39 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	85.63 ± 26.26 ^a	6
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	120	224.03 ± 24.89 ^b	6			RECUPERACIÓN ^{Ba1}	120	181.30 ± 17.61 ^b	6
	EXPOSICIÓN ^{Ca1}	24	207.39 ± 21.34 ^b	6	0.18 ^{C1}		EXPOSICIÓN ^{Ca1}	24	208.57 ± 22.75 ^b	6	
	EXPOSICIÓN ^{Ca1}	72	96.65 ± 11.79 ^a	6				EXPOSICIÓN ^{Ca1}	72	210.38 ± 13.59 ^b	6
	RECUPERACIÓN ^{Ca1}	168	90.99 ± 7.77 ^a	6				RECUPERACIÓN ^{Ca1}	168	191.86 ± 27.06 ^b	6
17 ¹	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	8.15 ± 0.37 ^a	6	10 ¹	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	6.42 ± 0.48 ^a	6
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	39.56 ± 7.07 ^a	6			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	29.73 ± 10.39 ^a	6
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	239.88 ± 36.89 ^b	6			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	211.35 ± 62.34 ^b	6
	EXPOSICIÓN ^{Ca1}	120	471.72 ± 52.49 ^b	6	0.18 ^{C1}		EXPOSICIÓN ^{Ca1}	120	607.65 ± 113.87 ^b	6	
	EXPOSICIÓN ^{Ca1}	24	417.24 ± 79.31 ^b	6				EXPOSICIÓN ^{Ca1}	24	280.49 ± 16.85 ^b	6
	RECUPERACIÓN ^{Ca1}	72	207.60 ± 19.66 ^b	6				RECUPERACIÓN ^{Ca1}	72	261.99 ± 24.26 ^b	6
RECUPERACIÓN ^{Ca1}	168	110.16 ± 14.59 ^a	6	RECUPERACIÓN ^{Ca1}	168	245.95 ± 17.95 ^b	6				

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

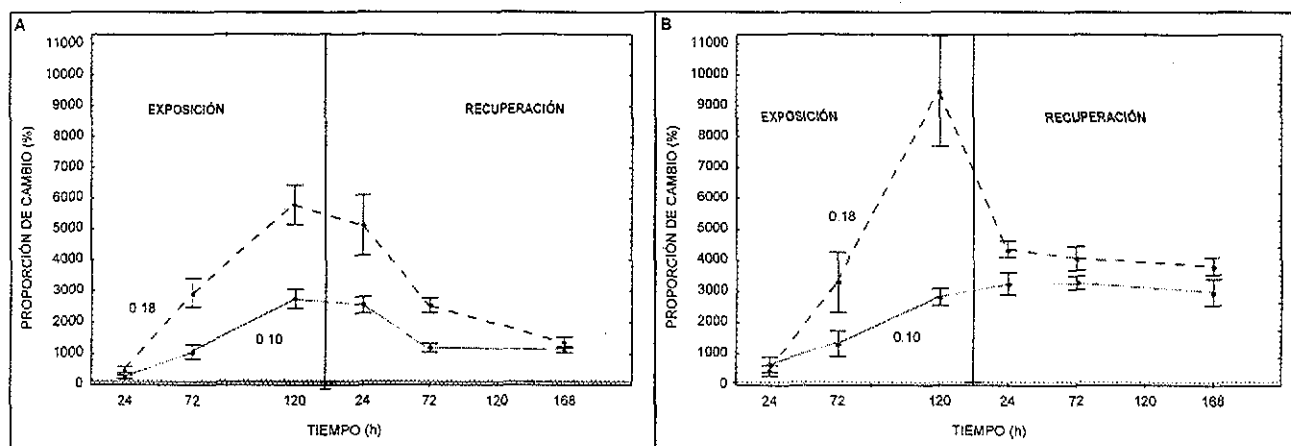


Figura 13. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la acumulación de cadmio en el hepatopáncreas de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

En 10 ups, el comportamiento de la acumulación en el hepatopáncreas de los camarones durante la exposición al cadmio fue similar al descrito para 17 ups. La acumulación significativa del cadmio se observó a las 120 h de exposición a 0.10 mg Cd/l y a las 72 h en 0.18 mg Cd/l, con incrementos de 28.2 y 32.9 veces respecto a los valores base iniciales ($p < 0.05$), con un máximo de 94.6 veces mayor al término de la exposición (120 h) en la concentración más elevada (0.18 mg Cd/l) ($p < 0.05$). Durante el periodo de recuperación, mientras que en 17 ups se observó una disminución gradual aunque no total del contenido de cadmio en el hepatopáncreas, en 10 ups no se observó una disminución significativa del metal acumulado en los camarones expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l ($p < 0.05$) manteniéndose al término de las pruebas en niveles de 19.4 y 24.8 veces más elevados respectivamente que los niveles normales del grupo testigo (Tabla 13; Figura 13).

La acumulación del cadmio en el hepatopáncreas no fue modificada por la salinidad del medio ($p > 0.05$), siendo la tasa de acumulación del metal en los camarones expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l en 10 y 17 ups similares ($p > 0.05$; ANCOVA) (Anexo III).

3.3. Metalotioneínas

3.3.1. Branquia

En los camarones del grupo testigo evaluados en 10 y 17 ups, los niveles base de la concentración de metalotioneínas en branquia fueron similares ($p > 0.05$) y se mantuvieron en un intervalo de 0.08 a 0.36 $\mu\text{g MT/g PH}$ (Tabla 14). El análisis estadístico efectuado denotó el efecto significativo de la exposición al cadmio sobre la concentración de metalotioneínas en las branquias de los camarones ($p < 0.05$); la salinidad y su interacción con el metal, no modificaron la respuesta ($p > 0.05$). Asimismo no se observaron diferencias significativas entre las etapas de exposición y recuperación al metal en cada tratamiento ($p > 0.05$) (Tabla 14).

En los camarones evaluados en 17 ups, la exposición al cadmio incrementó la concentración de metalotioneínas ($p < 0.05$); no obstante el incremento fue similar por la exposición a ambas concentraciones ($p > 0.05$). Durante la etapa de exposición al cadmio en 0.10 mg Cd/l las metalotioneínas en la branquia se incrementaron 72.2% respecto a los niveles iniciales a las 120 h de exposición ($p < 0.05$) y se mantuvieron elevadas (86%) incluso en las primeras 24 h de la etapa de recuperación; sin embargo este incremento no fue significativo ($p > 0.05$). A partir de las 72 h de recuperación, la concentración de metalotioneínas se redujo hasta alcanzar sus valores normales hasta el término del ensayo (Tabla 14; Figura 14A). De manera similar, si bien la exposición a 0.18 mg Cd/l incrementó la concentración de metalotioneínas en un 41.7% respecto a los niveles base iniciales, este aumento no fue significativo ($P > 0.05$). Durante la etapa de recuperación los niveles se redujeron hasta valores normales; sin embargo a las 168 h de recuperación se observó un incremento del 131% respecto a los valores base iniciales ($p < 0.05$) (Tabla 14; Figura 14A).

RESULTADOS

Tabla 14. Metalotioneínas en branquia ($\mu\text{g/g PH}$) de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	BRANQUIA $\mu\text{g/mg PH}$	n	Ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	BRANQUIA $\mu\text{g/mg PH}$	n
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	0.36 ± 0.073 ^a	4	10 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	0.18 ± 0.02 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	ND	4			24	0.26 ± 0.061 ^a	4	
	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	0.17 ± 0.034 ^a	4		0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	0.14 ± 0.042 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	0.08 ± 0.015 ^a	4			24	ND	4	
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	ND	4		0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	0.22 ± 0.073 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	0	0.36 ± 0.073 ^a	4			0	0.18 ± 0.02 ^a	4	
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	0.57 ± 0.042 ^a	4	10 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	0.57 ± 0.13 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	0.17 ± 0.033 ^a	4			72	0.51 ± 0.11 ^a	4	
	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	0.62 ± 0.12 ^a	4		0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	0.65 ± 0.067 ^b	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	0.67 ± 0.18 ^a	4			24	0.68 ± 0.096 ^b	4	
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	0.16 ± 0.015 ^a	4		0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	0.41 ± 0.175 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	0.13 ± 0.016 ^a	4			168	ND	4	
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	0.36 ± 0.073 ^a	4	10 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	0.18 ± 0.02 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	0.09 ± 0.034 ^a	4			24	0.09 ± 0.037 ^a	4	
	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	0.22 ± 0.108 ^a	4		0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	0.62 ± 0.034 ^b	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	0.51 ± 0.132 ^a	4			120	0.88 ± 0.017 ^b	4	
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	0.33 ± 0.13 ^a	4		0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	0.32 ± 0.049 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	72	0.37 ± 0.16 ^a	4			72	0.44 ± 0.063 ^a	4	
0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	0.83 ± 0.077 ^b	4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	0.37 ± 0.041 ^a	4		
	RECUPERACIÓN ^{Aa1}										

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

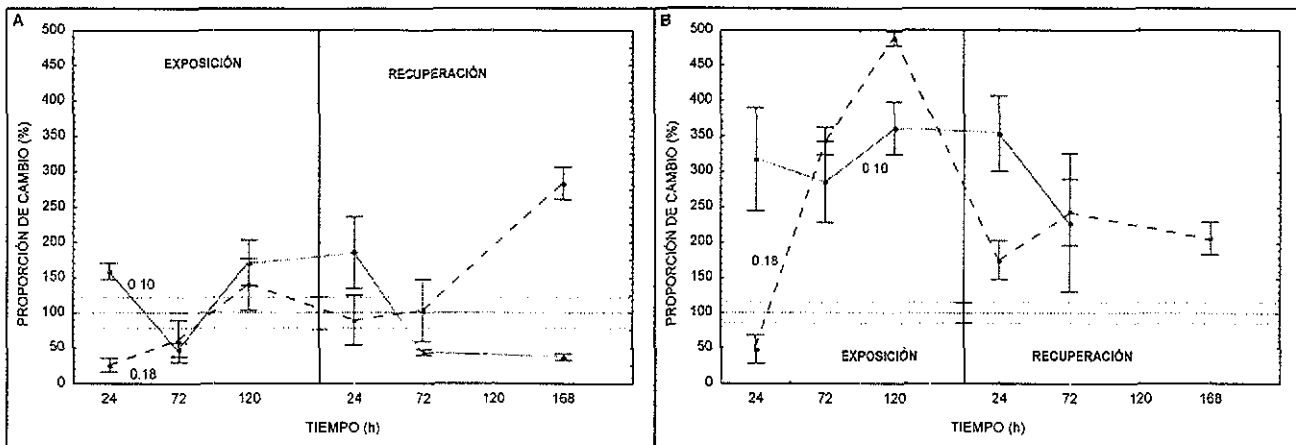


Figura 14. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de metalotioneínas en branquia de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

De manera similar a lo observado en 17 ups, en los camarones evaluados en 10 ups, los niveles de metalotioneínas en branquia se incrementaron al aumentar la concentración de cadmio en el medio. La exposición a 0.10 y 0.18 mg Cd/l incremento las metalotioneínas en branquia a partir de las 120 y 72 h de exposición, en niveles del 261 y 244.4% mayores respectivamente que los valores base iniciales ($p < 0.05$). Durante la etapa de recuperación, los niveles de metalotioneínas disminuyeron a los niveles normales a partir de las 72 h y de las 24 h en los camarones expuestos previamente a 0.10 y 0.18 mg Cd/l respectivamente ($p > 0.05$), si bien se mantuvieron en niveles de 127.7 y 105.6% mayores que los niveles base iniciales (Tabla 14; Figura 14B).

Al comparar ambas salinidades, no se obtuvo un efecto significativo ($p > 0.05$) a pesar de observarse en 10 ups una inducción en la síntesis de las metalotioneínas en la branquia por la exposición al cadmio.

3.3.2. Hepatopáncreas

En los camarones del grupo testigo evaluados en 17 y 10 ups, los niveles base de las metalotioneínas en hepatopáncreas fueron similares independientemente de la salinidad del medio ($p > 0.05$), manteniéndose en un intervalo de 0.04 a 0.20 $\mu\text{g MT/mg PH}$ (Tabla 15). El análisis

estadístico mostró un efecto significativo de la exposición al cadmio ($p < 0.05$), más no así de la salinidad ni de la interacción cadmio-salinidad ($p > 0.05$). Se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la etapa de exposición-recuperación al metal sólo en los organismos expuestos en 0.10 mg Cd/l y evaluados en 10 ups ($p < 0.05$) (Tabla 15).

En los camarones evaluados en 17 ups, la concentración de metalotioneínas se modificó sólo, por la exposición a 0.18 mg Cd/l, incrementándose a partir de las 24h de exposición en un 164.3% respecto a los valores base iniciales ($p < 0.05$). Durante la etapa de recuperación al metal, los niveles de metalotioneínas permanecieron elevados, 214.3% mayores que los niveles base iniciales ($p < 0.05$) (Tabla 15; Figura 15A).

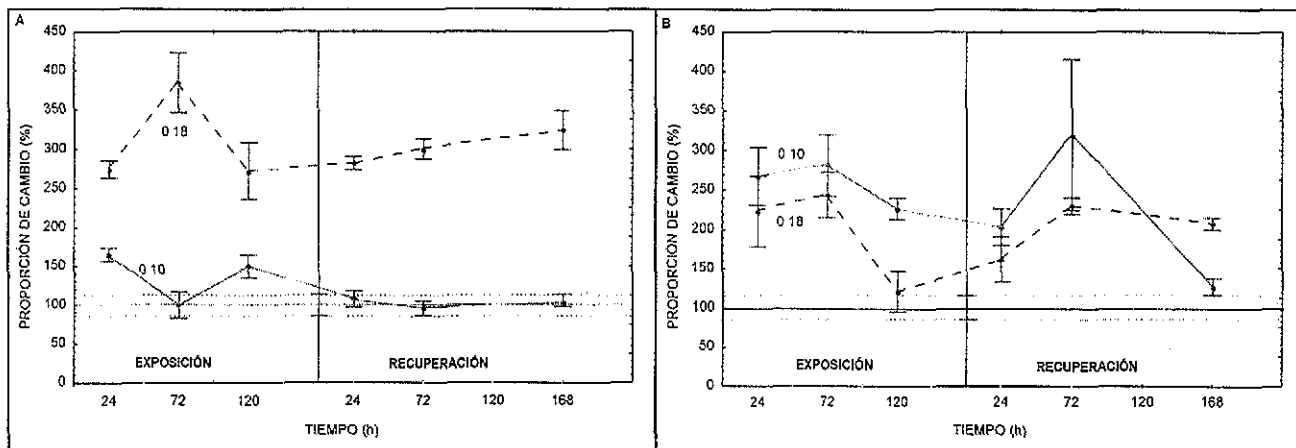


Figura 15. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la concentración de metalotioneínas en hepatopáncreas de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

En los organismos evaluados en 10 ups, la exposición al cadmio incrementó los niveles de metalotioneínas a partir de las 24 h de exposición, con incrementos del 166.7 y 125% en 0.10 y 0.18 mg Cd/l respecto a los valores base iniciales ($p < 0.05$). Al colocar a los camarones expuestos en 0.10 mg Cd/l en un medio libre del metal, los niveles de metalotioneínas disminuyeron a los valores normales iniciales a partir de las 72 h; sin embargo, aunque en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l se presentó una recuperación desde las 120 h de exposición, a partir de las 72 h en un medio libre del metal, los niveles de metalotioneínas se incrementaron en un 133.3% ($p < 0.05$) sin observarse una recuperación al término del ensayo (Tabla 15; Figura 15B).

RESULTADOS

Tabla 15. Metalotioneínas en hepatopáncreas ($\mu\text{g}/\text{mg PH}$) de los juveniles de *L. seifurus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	HEPATOPÁNCREAS $\mu\text{g}/\text{mg PH}$	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	HEPATOPÁNCREAS $\mu\text{g}/\text{mg PH}$	n
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	0.14 ± 0.02 ^a	4	10 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	0.12 ± 0.007 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	0.15 ± 0.022 ^a	4			EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	0.13 ± 0.008 ^a	4
	RECUPERACIÓN ^{Aa1}	120	0.12 ± 0.013 ^a	4	RECUPERACIÓN ^{Aa1}		120	0.15 ± 0.012 ^a	4		
	0.10 ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{ABa1}	24	0.11 ± 0.05 ^a	4		0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{ABa1}	24	0.09 ± 0.019 ^a	4
		RECUPERACIÓN ^{ABa1}	168	0.04 ± 0.09 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{ABa1}	168	0.20 ± 0.031 ^a	4
	18 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	0.14 ± 0.02 ^a		4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	0.12 ± 0.007 ^a
RECUPERACIÓN ^{Ba1}			24	0.22 ± 0.012 ^a	4	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24			0.32 ± 0.044 ^b	4
RECUPERACIÓN ^{Ba1}		72	0.14 ± 0.023 ^a	4	RECUPERACIÓN ^{ABb1}	72	0.34 ± 0.046 ^b		4		
0.18 ^{B1}		EXPOSICIÓN ^{Ca1}	120	0.20 ± 0.028 ^a	4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}		120	0.27 ± 0.017 ^b	4
		RECUPERACIÓN ^{Ca1}	24	0.15 ± 0.014 ^a	4		RECUPERACIÓN ^{Ba1}		24	0.24 ± 0.028 ^b	4
0.18 ^{B1}		EXPOSICIÓN ^{Ca1}	72	0.13 ± 0.013 ^a	4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}		72	0.38 ± 0.11 ^a	4
	RECUPERACIÓN ^{Ca1}	168	0.14 ± 0.007 ^a	4	RECUPERACIÓN ^{Ba1}		168	0.15 ± 0.013 ^a	4		
0.18 ^{B1}	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	0.14 ± 0.012 ^a	4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	0.12 ± 0.007 ^a	4	
		RECUPERACIÓN ^{Ca1}	24	0.37 ± 0.015 ^b	4			RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	0.27 ± 0.054 ^b	4
0.18 ^{B1}	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	0.52 ± 0.052 ^b	4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	0.29 ± 0.034 ^b	4	
		RECUPERACIÓN ^{Ca1}	120	0.37 ± 0.049 ^b	4			RECUPERACIÓN ^{Ba1}	120	0.15 ± 0.032 ^a	4
0.18 ^{B1}	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	0.38 ± 0.011 ^b	4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	0.20 ± 0.034 ^a	4	
		RECUPERACIÓN ^{Ca1}	72	0.41 ± 0.017 ^b	4			RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	0.28 ± 0.012 ^b	4
0.18 ^{B1}	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	0.44 ± 0.033 ^b	4	0.18 ^{C1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	0.25 ± 0.009 ^b	4	
		RECUPERACIÓN ^{Ca1}						RECUPERACIÓN ^{Ba1}			

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

Si bien la salinidad no ejerció un efecto significativo en la inducción en la síntesis de metalotioneínas ($p>0.05$), la exposición a 0.08 mg Cd/l en 10 ups incrementó la concentración de metalotioneínas en un 144.4% respecto a 17 ups ($p>0.05$). En contraste, la exposición a 0.18 mg Cd/l incrementó los niveles de metalotioneínas en el hepatopáncreas de los camarones evaluados en 17 ups en un 59.3% ($p<0.05$) respecto a los evaluados en 10 ups (Tabla 15).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. DISCUSIÓN

En los crustáceos acuáticos, las branquias son el principal órgano para la regulación osmótica, así como para la respiración (Dhavale et al., 1988). En el mantenimiento del balance osmótico y la composición iónica intracelular y por lo tanto de la homeóstasis osmótica celular, participan de manera fundamental las bombas iónicas de la familia de las ATPasas del tipo "P" de las cuales son miembros las Na^+/K^+ -ATPasa, H^+/K^+ -ATPasa y Ca^{+2} -ATPasa (Dunbar, 2001; Lingrel et al., 1994). La enzima Na^+/K^+ -ATPasa en particular se localiza en la membrana basolateral de la branquia y está implicada en el transporte activo de Na^+ y K^+ esencial en la regulación iónica del medio interno de los organismos (Pequeux, 1995; Pequeux et al., 1984).

En los crustáceos acuáticos hiperreguladores, la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasas en la branquia tiende a incrementarse de una manera adaptativa en salinidades bajas, en donde el gradiente de concentración de sales entre el medio interno y el medio externo es mayor. El aumento en la actividad de la enzima branquial en un medio diluido y por lo tanto la incorporación de los iones Na^+ y K^+ contribuye de manera fundamental al manteniendo de la regulación iónica y osmótica del medio interno de los organismos. Lo anterior se ha demostrado en *Carcinus maenas* confirmando la relación entre actividad enzimática y la salinidad reportada en diversos vertebrados e invertebrados hiperreguladores (Figura 16) (Luco y Flik, 1999; Pequeux et al., 1984).

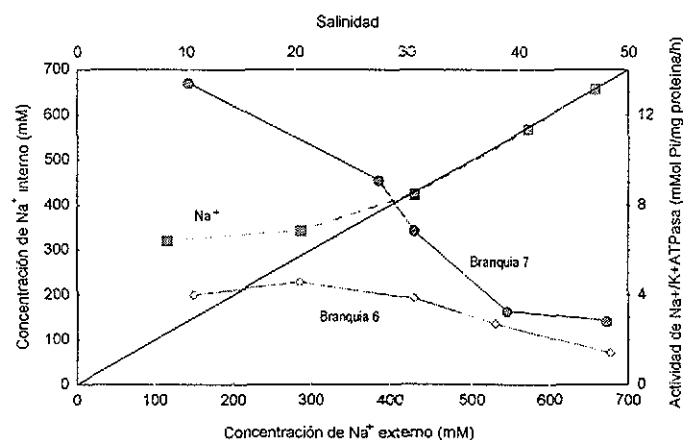


Figura 16 . Regulación de Na^+ en hemolinfa y actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en branquias de *Carcinus maenas*, en relación a la salinidad del ambiente (tomado de Pequeux et al., 1984).

En los juveniles de *Litopenaeus setiferus*, del grupo testigo se observó este cambio adaptativo en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial a bajas salinidades para la regulación eficaz de su medio interno, observándose en 10 ups una actividad enzimática 111.3% mayor que en 17 ups, manteniéndose similar la presión osmótica de los camarones en ambas salinidades. Cabe señalar que en 10 ups los camarones hiperregulan activamente mientras que en 17 ups, salinidad correspondiente a su punto isosmótico, el trabajo osmótico es menor (Ríos, 2001; Pequeux, 1984).

La modulación y los cambios adaptativos en corto tiempo de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa en branquia, se relaciona con una reestructuración celular y proliferación de la enzima en la membrana, efectos que se mantienen a largo plazo. En el cangrejo azul *Callinectes sapidus*, la actividad de la ATPasa aumenta abruptamente a pocas horas de la reducción de la salinidad, pero requiere de aproximadamente de 2 semanas para alcanzar un nivel estable (Towle, 1981, en Pequeux et al., 1984). En el presente estudio el cambio de la salinidad fue gradual (1 ups/día a partir del mantenimiento) y manteniendo a los juveniles de *L. setiferus* por cuatro días más en cada salinidad (17 y 10 ups) antes de iniciar los bioensayos, periodo en el cual se obtuvo la estabilidad de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa la cual se mantuvo constante durante todo el tiempo que duró el bioensayo.

En crustáceos, el efecto tóxico del cadmio, así como otros metales pesados, está relacionado con el deterioro estructural y funcional de las branquias, órgano fundamental en la osmoregulación del organismo y principal sitio de entrada de estos metales (Dhavale et al., 1988; Pequeux, 1995, Satyavathi and Prabhakara, 2000; Celso, 2000).

La tasa de incorporación del cadmio en los organismos acuáticos se relaciona con la fisicoquímica del metal en solución, particularmente con la concentración del ión libre del metal y por ende con su biodisponibilidad, donde las respuestas y la condición fisiológica particular del organismo pueden interactuar, modificando la tasa de incorporación del metal (Rainbow, 1997; Bejerregaard, 1990). La concentración de los iones libres de Cd^{2+} que puedan ingresar al organismo, disminuye conforme aumenta la salinidad por la formación de complejos con Cl^- (Saquid, 1992). De tal manera, en bajas salinidades se espera un deterioro funcional y estructural de las branquias de los juveniles de *L. setiferus* debido a una mayor bioacumulación del cadmio.

En los juveniles de *L. setiferus* expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l, la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa fue inhibida significativamente, en mayor magnitud en los camarones evaluados en 10 ups que en 17 ups.

En crustáceos que hiperregulan en un medio diluido, el efecto tóxico de los metales es mayor debido a la mayor biodisponibilidad de los iones libres y por lo tanto a una mayor incorporación del metal (Rainbow, 1997, Saquid, 1992; Bejerregaard, 1990). Este comportamiento se observó en los juveniles de *L. setiferus* donde la inhibición de la actividad enzimática de la Na⁺/K⁺-ATPasa fue mayor en 10 ups (41 y 52 % en 0.10 y 0.18 mg Cd/l) que la observada en 17 ups (18 y 38 % en 0.10 y 0.18 mg Cd/l). Dicha inhibición se relacionó con la bioacumulación del metal en la branquia a excepción de los organismos expuestos a 0.18 mg Cd/l en 10 ups donde, contrario a lo esperado, la acumulación del cadmio en la branquia fue menor a la observada en los camarones evaluados en 17 ups a la misma concentración del metal. Es posible suponer que en 17 ups y 0.18 mg Cd/l la concentración del metal registrada en la branquia de los camarones obedezca a su rápida transferencia al hepatopáncreas reduciendo los niveles tóxicos del cadmio en la branquia como fue observado en los juveniles de *L. setiferus*.

La relación entre el deterioro funcional de la Na⁺/K⁺-ATPasa branquial y la bioacumulación de metales pesados ha sido reportado por la exposición al cadmio en *Carcinus maenas* (Postel et al., 1998), *L. setiferus* (Vanegas, 1996), *Chasmagnathus granulata* (Rodríguez-Moreno et al., 1998) y por la exposición al plomo en *Penaeus indicus* (Satyavathi and Prabhakara, 2000) (Tabla 16).

La disminución observada de la actividad de la Na⁺/K⁺-ATPasa en el tejido branquial de los juveniles de *L. setiferus* puede ser debido a posibles daños de alguno o varios de los diversos sitios de regulación de la actividad como pueden ser: desacoplamiento de la fosforilación (Dunbar, et al. 2001; Lehninger, 1993) o del sitio de fosforilación (Lingrel et al., 1994; Pedemonte et al., 1997) y daño a la membrana basolateral de los ionocitos (Pequeux, 1995; Pequeux, 1984). En la porción extracelular de la subunidad β se encuentran tres puentes disulfuro altamente conservados, si estos puentes se alteran la actividad de la enzima desaparece (Shoshani and Ordaz-Gallo, 2001; Blanco and Mercer, 1998). Este pudiera ser el sitio más claro en donde se

puedan unir los iones de cadmio que se va acumulado en la branquia, afectando la estructura de la subunidad β y por ende la función de la Na^+/K^+ -ATPasa.

De acuerdo a lo reportado en literatura, la alteración de la Na^+/K^+ -ATPasa parece ser especie-específica y puede en algunas especies relacionarse con el grado y el tiempo de exposición (Tabla 16) como al parecer ocurrió en *L. setiferus*.

Tabla 16. Actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa publicados para diferentes crustáceos en presencia de cadmio. \uparrow incrementa, \downarrow disminuye.

ESPECIES	CONCENTRACIÓN, TIEMPO Y MEDIO DE EXPOSICIÓN	EFECTO EN LA ACTIVIDAD DE LA Na^+/K^+ -ATPasa	REFERENCIA
<i>Procambarus clarkii</i>	1 mg/l, 4 días, A D.	Sin efecto	Torreblanca et al., 1989
<i>Homarus americanus</i>	6 $\mu\text{g/l}$, 30 días, 24-26 ups	Sin efecto	Tucker, 1979
<i>Cancer irroratus</i>	1 y 10 mg/l, in vitro	1 mg/l Sin efecto 10 mg/l \downarrow 37 %	Tucker and Matte, 1980
<i>Scylla serrata</i>	0.3-24 mg/l, 30 ups 4 días	0.3 0.6 1.5 24 \downarrow 62%	Dhavale et al., 1988
	10 días	\uparrow 11% \downarrow 47% \downarrow 58%	
	20 días	\downarrow 26% \downarrow 63% \downarrow 71%	
	30 días	\downarrow 26% \downarrow 30% \downarrow 45%	
<i>Chasmagnathus granulata</i>	0.1, 0.25 mg/l, 18 días, 30 ups, in vivo	Sin efectos significativos	Rodríguez-Moreno et al., 1998
	0 – 100 mg/l, 40 min. in vitro	Concentración dependiente \downarrow 97% con 100 mg/l Cd	
<i>Carcinus maenas</i>	1×10^{-3} mol/l, 8 ups in vitro	\downarrow 31%	Postel et al., 1998
<i>Litopenaeus setiferus</i>	0.05 y 0.14 mg/l, 21 días	0.05 sin efecto 0.14 mg/l \downarrow 11.56%	Vanegas, 1996
	0.10 y 0.18 mg/l, 5 días, 17 ups	0.10 mg/l \downarrow 23.4% 0.18 mg/l \downarrow 41.8%	
<i>Litopenaeus setiferus</i>	0.10 y 0.18 mg/l, 5 días, 10 ups	0.10 mg/l \downarrow 43.1% 0.18 mg/l \downarrow 53.2%	Este trabajo

En los juveniles de *L. setiferus*, al ser transferidos a un medio libre de cadmio, la recuperación de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se relacionó con la salinidad de medio y con el nivel de exposición previo al cadmio. No obstante que en los camarones evaluados en 10 ups la exposición

al cadmio alteró en mayor grado la actividad enzimática, al término del periodo de recuperación la Na^+/K^+ -ATPasa recobró la actividad normal inicial. En contraste en los camarones evaluados en 17 ups, sólo en los camarones expuestos en la menor concentración de cadmio se observó la recuperación de la Na^+/K^+ -ATPasa y donde la inhibición observada en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l probablemente obedezca a un daño permanente o de largo plazo en la enzima.

Postel, et al. (1998) hacen referencia que para *Carcinus maenas* la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa en la branquia es irreversible a una concentración de Cd de 1×10^{-3} mol/l. Para otras especies ocurre lo contrario, no hay un efecto significativo sobre la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa a diferentes concentraciones y tiempos de exposición (Tabla 16). El daño sobre el tejido branquial depende de la concentración y del tiempo de exposición al metal y en casos puede llegar a ser tal que la recuperación requiera mucho tiempo o no se presente (Papathanassiou, 1985). Para *L. setiferus* el efecto del cadmio en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa es reversible a mediano plazo, pero solo a concentraciones bajas del metal (0.10 mg Cd/l) en 17 ups y hasta 0.18 mg Cd/l en 10 ups.

La recuperación de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa independientemente de la concentración de cadmio que se mantiene acumulado en la branquia, sugiere la participación de dos mecanismos acoplados. Por un lado, la síntesis de *novo* de la Na^+/K^+ -ATPasa inducida por la degradación de la enzima inactiva (Beguin et al., 2000) y por otro, el enlace del ión libre de cadmio a metalotioneínas, o su depósito en lisosomas y/o precipitados insolubles en compartimientos celulares, limitando su disponibilidad y por lo tanto su toxicidad (Hamza-Chaffai et al., 1999; Bejerregaard, 1991, 1990).

Independientemente de los mecanismos involucrados, los resultados obtenidos en *L. setiferus* sugieren que en los camarones mantenidos en 17 ups la acumulación del cadmio en la branquia en niveles de 332.31 ± 11.73 $\mu\text{g/g}$ PS ocasiona el deterioro funcional de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa, mientras que en 10 ups la actividad enzimática en la branquia se recupera aún con niveles bioacumulados del metal similares. Estos resultados sugieren diferentes mecanismos de la acción tóxica del metal en las distintas salinidades.

Dado que la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa está directamente relacionada con el transporte activo de Na^+ y K^+ , su alteración funcional por estresores ambientales incluido el cadmio, altera en consecuencia la regulación iónica y osmótica del medio interno de los organismos (Lignot et al., 2000). El Na^+ aunado al Cl^- son los mayores componentes inorgánicos en la hemolinfa de los crustáceos y contribuyen de manera fundamental, hasta en un 90% en el mantenimiento de la presión osmótica de los crustáceos (Pequeux, 1995; Castille y Lawrence, 1981a y 1981b).

En los juveniles de *L. setiferus*, la exposición al cadmio modificó la regulación de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- , alteraciones que fueron diferentes en los organismos evaluados en condiciones de hiperregulación (10 ups) y de isosmoticidad (17 ups). De manera global, la regulación de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- fueron alterados fundamentalmente por la exposición a 0.18 mg Cd/l. En 10 ups se observó la reducción del Na^+ y Cl^- mientras el K^+ no fue modificado; en contraste en 17 ups el Na^+ se incrementó y el K^+ y Cl^- se redujeron. No obstante, la recuperación en la regulación de los iones ocurrió rápidamente en un medio libre del metal a diferencia de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa, lo cual sugiere la participación de mecanismos de transporte adicionales para el mantenimiento de los iones en la hemolinfa de los camarones.

La inhibición de la actividad enzimática en crustáceos hiper-iono reguladores ocasiona la pérdida difusional del Na^+ de la hemolinfa al medio externo y en consecuencia la reducción de la presión osmótica del medio interno. (revisión en Lignot et al., 2000; Pequeux et al., 1984) no obstante en los juveniles de *L. setiferus* el mantenimiento de los niveles de Na^+ independientemente de la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial sugiere que el grado de inhibición de la enzima es insuficiente para afectar la regulación del ión o bien la participación de mecanismos adicionales para la incorporación del ión a la hemolinfa, ya sea por el incremento de la entrada del Na^+ por la branquia o por su reabsorción en la orina. Tales mecanismos han sido sugeridos en *Cancer magister* expuestos al metoxicloro y en *Cherax destructor* expuestos al plomo, donde independientemente de la inhibición de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa no se observaron efectos en la regulación iónica (revisión en Lignot et al., 2000).

En los juveniles de *L. setiferus* es probable que el Na^+ que se pierde de la hemolinfa del organismo es recuperado por las bombas de intercambio $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ y el cotransporte

$K^+/Cl^-/Na^+$ existentes en las membranas (Pequeux, 1995; Lucu, 1990; Pequeux, 1984). El transporte de Na^+/NH_4^+ puede explicar una pequeña parte de la entrada de Na^+ en las branquias posteriores como ha sido documentado en *Eriocheir sinensis* (Pequeux, 1995). No obstante el intercambio $2Na^+/1H^+$, ampliamente demostrado en crustáceos de ambientes salinos y de agua dulce (Lucu, 1990), probablemente desempeñe un papel importante en la absorción de Na^+ en los juveniles de *L. setiferus* expuestos al cadmio.

La mayor alteración iónica en los juveniles expuestos al cadmio se observó en la regulación del Cl^- en mayor grado por la exposición a 0.18 mg Cd/l con reducciones similares del 34 al 36% en 10 y 17 ups; no obstante, en un medio libre del metal se observó la recuperación completa en la regulación del ión aunque de manera más rápida en los camarones evaluados en 17 ups.

En general, en los crustáceos acuáticos, una de las vías de captación de Cl^- en las branquias posteriores se lleva a cabo fundamentalmente por el intercambio iónico Cl^-/HCO_3^- , el bicarbonato es el producto de la reacción $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$ la cual es catalizada por la anhidrasa carbónica; esta enzima está involucrada en varios procesos fisiológicos como es el intercambio de gases, el balance ácido-base, la calcificación y el intercambio iónico, presentándose una fuerte correlación entre la actividad de esta enzima con el transporte del ión Cl^- (Pequeux, 1995; Lucu, 1990; Henry, 1988). Es posible que en los juveniles de *L. setiferus*, el cadmio inhiba la actividad de la anhidrasa carbónica alterándose el intercambio Cl^-/HCO_3^- y ocasionando la disminución del Cl^- observado en la hemolinfa de los camarones.

La inhibición de la anhidrasa carbónica por efecto del cadmio ya se ha sugerido anteriormente en *L. setiferus* (Vanegas, 1996) y en *Eriocheir sinensis* con mercurio (Pequeux, 1995) y se ha confirmado para *Anguilla anguilla* en branquia e intestino en donde la inhibición por efecto del cadmio es concentración-tiempo-dependiente, siendo la isoforma citosólica más sensible a la acción del metal que la isoforma unida a la membrana (Lionetto et al., 2000). Esta inhibición también se ha demostrado en *Chasmagnathus granulata* por la exposición a diferentes metales pesados (Cu, Cd y Zn) y a diferentes salinidades; en particular el Cd ocasiona la disminución de la actividad de la anhidrasa carbónica sólo a bajas salinidades (2.5 ‰ y 1.5 mg Cd/l), alterando a su vez los niveles de Na^+ y Cl^- (Vitale, et al., 1999).

En los juveniles de *L. setiferus* expuestos al cadmio, la reducción de los iones Cl^- fue similar en 10 y 17 ups lo cual sugiere que la anhidrasa carbónica es inhibida de manera similar independientemente de la salinidad. El hecho de que la regulación del Cl^- se recupera en los camarones en un medio libre del metal sugiere a su vez que la inhibición de la anhidrasa carbónica es reversible.

No obstante las alteraciones observadas fundamentalmente en la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa y en la regulación iónica del Cl^- en los juveniles de *L. setiferus* expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l la presión osmótica de los camarones fue alterada sólo por la exposición a 0.18 mg Cd/l; en 10 ups la presión osmótica se redujo 15% mientras que en 17 ups esta se incrementó 13%. De tal manera en los camarones evaluados en condición de hiperregulación (10 ups) el cadmio redujo la capacidad osmoreguladora de los camarones mientras que los evaluados en 17 ups se perdió la condición de isosmoticidad generando una hiperregulación, alteraciones relacionadas con las modificaciones en la regulación de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- .

En un medio donde la biodisponibilidad del cadmio a bajas salinidades es mayor, parece que el efecto del metal depende de la capacidad osmoreguladora del organismo. En juveniles de *Penaeus japonicus* expuestos a 2 y 4 mg Cd/l disminuye la capacidad osmoreguladora en un 53 y 47 % a 38 % y 16 %; en *Palaemon elegans*, 1 a 7.5 mg Cd/l afecta la presión osmótica con 13% de agua marina, pero no con 60% de agua marina (revisión en Lignot, 2000). Lo mismo se ha observado para otros organismos (Tabla 17). De manera similar, la capacidad osmoreguladora de los juveniles de *L. setiferus* se ve afectada con relación a la salinidad en presencia del cadmio y al nivel de acumulación del metal en la branquia.

La capacidad osmoreguladora de los crustáceos, definida como la diferencia entre la presión osmótica de la hemolinfa y el medio externo, se considera como un indicador de la condición fisiológica de los organismos (Lignot, et al., 2000; Bambang, et al., 1995). El efecto tóxico del cadmio sobre el deterioro de la capacidad osmoreguladora ha sido ampliamente documentada en crustáceos acuáticos (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto en la capacidad osmorreguladora y regulación iónica reportada para diferentes crustáceos con presencia de cadmio: PO (Presión Osmótica), CO (Capacidad Osmoreguladora).
 ↑ incremento, ↓ disminución.

ESPECIES	CONCENTRACIÓN, TIEMPO Y MEDIO DE EXPOSICIÓN	EFFECTO	REFERENCIA
<i>Jarea albifrons</i>	10 mg/l 20 mg/l	No afectó PO a 3.4 ‰ y 34‰ ↑ PO por ≈ 40% a 17 ‰	Jones, 1975
<i>Idotea baltica</i>	10 mg/l	No afectó PO a 27‰	Jones, 1975
<i>I. emarginata</i>	10 mg/l	No afectó PO a 27‰	Jones, 1975
<i>I. neglecta</i>	10 mg/l	↓ PO a 27‰	Jones, 1975
<i>Penaeus japonicus</i> (juveniles 13 ± 1 g)	2, 4 mg/l	Tiempo-concentración-dependiente ↓ CO 53% a 38 ‰ y ↓ CO 47% a 16‰	Bambang et al., 1995
<i>Callinectes sapidus</i> (juveniles 15-20 mm)	50, 100 µg/l	Concentración-dependiente ↓ PO 25% a 2.5 ‰	Guerin and Stickle, 1995
<i>Carcinus maenas</i> (25-50 g)	1 mg/l	No afectó PO y Na ⁺ de 13.6 ‰ a 24‰	Bjerregaard, 1991
<i>Carcinus maenas</i> (18-30 g)	0.5-8 mg/l	Concentración-dependiente ↑ PO de 20-50% de acuerdo a la salinidad	Thurberg et al., 1973
<i>Chasmagnathus granulata</i>	1.25, 5 mg/l	↓ Na ⁺ en 2.5 ‰ pero no afecta en 30‰, no afecta Cl ⁻ a 2.5‰ y 30 ‰	Thuberg et al., 1973
<i>Litopenaeus setiferus</i> (juveniles 2.1 - 7.6 g)	0.05-0.14 mg Cd/l expuestos 21 días	No afectó PO	Vanegas, 1996
<i>Litopenaeus setiferus</i> (juveniles 3-4.5 g)	0.10 mg/l expuestos 5 d.	No afectó PO a 17 ups y 10 ups No afectó Na ⁺ , ↓ K ⁺ y ↓ Cl ⁻ a 17 ups No afectó Na ⁺ y Cl ⁻ , ↑ K ⁺ a 10 ups	Este estudio
	0.18 mg/l expuestos 5 d.	↑ PO a 17 ups y ↓ PO a 10 ups No afectó Na ⁺ , ↓ K ⁺ y ↓ Cl ⁻ a 17 ups ↓ Na ⁺ y Cl ⁻ , No afectó K ⁺ a 10 ups	

En *Carcinus maenas* la alteración en la regulación osmótica se observa después de una exposición de 48 h en un intervalo de 0.5 a 8 mg/l de cadmio (Thurberg et al., 1973), si bien los niveles de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ se ven afectados en una concentración de 10 mg/l de cadmio (Bambang et al., 1995). A su vez, la exposición al cadmio ocasiona la reducción en la presión osmótica de *Idotea neglecta* (Jones, 1975) y *Callinectes sapidus* (Guerin and Stickle, 1995). Tales alteraciones se relacionaron con el deterioro de la regulación iónica de los organismos. Modificaciones similares

en la regulación iónica y osmótica han sido observadas en *Carcinus maenas* por la exposición al cobre (Hebel et al., 1997) y por mercurio (Pequeux, 1995).

En crustáceos, el deterioro en la regulación iónica y osmótica por la exposición a los metales pesados se ha asociado a su vez a la alteración en la permeabilidad corporal modificando el balance hídrico de los organismos (Espina y vanegas, 1996a; Pequeux et al., 1984). No obstante, el contenido corporal de agua de los juveniles de *L. setiferus* fue afectado por la presencia del cadmio en el medio sólo en los camarones evaluados en 10 ups observándose una pequeña pero significativa deshidratación. Así es posible suponer que sólo en bajas salinidades el cadmio altera la permeabilidad corporal de los camarones lo cual a su vez se relaciona con la reducción observada en la regulación iónica y osmótica en esta condición salina.

En los juveniles de *L. setiferus* la recuperación de la presión osmótica aún en la etapa de exposición al cadmio y de manera previa a la recuperación de los iones Cl^- y a pesar de la inhibición de la Na^+/K^+ -ATPasa, sugiere la eficiente participación de mecanismos de compensación en los camarones para el mantenimiento de la homeostasis osmótica. Esta compensación de la presión osmótica puede ser explicada por la participación de componentes orgánicos que ayudan a mantener estable la presión osmótica, como puede ser el aumento observado en las proteínas totales en hemolinfa de los camarones, aunado posiblemente al incremento en la participación de aminoácidos libres (Lucu, 1990) lo cual se tradujo a su vez en una mayor inversión energética en los juveniles de *L. setiferus*. Mecanismos similares se han sugerido en *Idotea emarginata* e *I. baltica* (Jones, 1975) y en *L. setiferus* (Vanegas, 1996) (Tabla 17) así como en *Homarus americanus* (Thuberg et al., 1973) en los que la exposición al cadmio no modifican la presión osmótica de los organismos.

En crustáceos, los niveles de proteína en la hemolinfa se relacionan con la eliminación rápida del cadmio y su transferencia al hepatopáncreas (Klaassen et al., 1999; Martín y Rainbow, 1998; Bjerregaard, 1990). En los juveniles de *L. setiferus* el incremento observado en las proteínas totales en hemolinfa se correlacionó positivamente con el cadmio acumulado en la branquia y en el hepatopáncreas durante el periodo de exposición en ambas salinidades y sugiere que la velocidad de transferencia del cadmio de la branquia al hepatopáncreas es rápida y mayor en baja

salinidad y en los organismos expuestos a 0.18 mg Cd/l. Estos resultados coinciden con lo reportado en *Carcinus maenas* (Bjerregard, 1990) en los que el 70% del cadmio relacionado a las proteínas de la hemolinfa se pierde en 22 h. Asimismo, el mayor incremento observado en los niveles de proteína en la hemolinfa de los camarones evaluados en 10 ups y expuestos a 0.18 mg Cd/l (107%; 142.14 mg/ml), permite suponer que debido a la mayor disponibilidad de los iones del metal a bajas salinidades y a una mayor entrada al organismo, ocurre una mayor inducción de proteínas para poder reducir el efecto tóxico del cadmio en el organismo.

En los crustáceos, después del ingreso del metal, ya sea vía solución o por alimento, éste es transportado a través del cuerpo del organismo para ser acumulado, quizás, en un órgano blanco o para ser excretado (Rainbow, 1997). La desintoxicación de metales traza es típicamente realizado por la unión del metal a sitios de alta afinidad en metalotioneínas o ferritina o en gránulos insolubles, frecuentemente a base de fosfatos (revisión en Legras et al., 2000). En la hemolinfa, el cadmio es captado por proteínas, principalmente por las metalotioneínas, proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteínas, las cuales se inducen ante la presencia de metales y cuyo enlace al metal minimiza sus efectos tóxicos (Hogstrand y Haux, 1991; Legras, et al. 2000; Roesijadi, 1992; Klaassen, et al. 1999). De acuerdo con Klaassen et al., (1999), las metalotioneínas son las responsables del control del cadmio en la hemolinfa y su regulación en relación al medio externo, para reducir el daño tóxico del metal. Este mecanismo ha sido reportado en *Carcinus maenas* expuesto al cadmio (Wright and Brewer, 1979), y como ha sido reportado en otros crustáceos, puede ser en *L. setiferus* un factor importante en el transporte del cadmio de la branquia al hepatopáncreas a través de la hemolinfa (Wright and Brewer, 1979 y Bambang, et al., 1995).

En los juveniles de *L. setiferus* el aumento de la proteína total en la hemolinfa por la exposición al cadmio se correlacionó positivamente con el aumento de metalotioneínas en la branquia de los camarones sugiriendo que la transferencia del metal de la branquia al hepatopáncreas a través de la hemolinfa ocurre fundamentalmente por su enlace a las metalotioneínas.

En los camarones, la concentración de metalotioneínas en branquia fue mayor que en hepatopáncreas en ambas salinidades. Sin embargo, la inducción de metalotioneínas en branquia y en hepatopáncreas en 10 ups es mayor que en 17 ups. En baja salinidad, la inducción en la síntesis

de metalotioneínas en la branquia es tiempo-concentración-dependiente y ocurre bajo concentraciones de 290-300 $\mu\text{g Cd/g PS}$. En contraste en 17 ups durante la exposición al cadmio, aún niveles bioacumulados del metal de 332 $\mu\text{g Cd/g PS}$ no inducen la síntesis de metalotioneínas. Estos resultados sugieren que la mayor biodisponibilidad de los iones libres de cadmio en baja salinidad y su mayor incorporación, disparan tanto los mecanismos de síntesis de metalotioneínas como la rápida transferencia del metal al hepatopáncreas como mecanismo de desintoxicación y protección celular al efecto tóxico del cadmio, lo cual se reafirma con la bioacumulación del metal observada en la branquia y en el hepatopáncreas. En 17 ups es posible suponer que la mayor proporción del cadmio se enlaza rápidamente a proteínas de mayor peso molecular (como puede ser la Na^+/K^+ -ATPasa) o bien se asocia a precipitados insolubles limitando la inducción branquial de la síntesis de metalotioneínas y determinando una mayor acumulación total del cadmio en el tejido particularmente en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l.

Estos resultados sugieren que la inducción de las metalotioneínas en los juveniles de *L. setiferus* es dependiente de la proporción de cadmio soluble en las células branquiales. Lo anterior se observó a su vez en el comportamiento de las metalotioneínas en el hepatopáncreas de los camarones. En 10 ups la inducción de metalotioneínas se asoció con una bioacumulación no significativa de 30 a 43 $\mu\text{g Cd/g PS}$ mientras que en 17 ups, 0.10 mg Cd/l no indujo la síntesis de metalotioneínas aún bajo concentraciones de cadmio de 224 $\mu\text{g Cd/g PS}$ en tejido; no obstante en 0.18 mg Cd/l se observó una inducción proteica aún desde niveles bioacumulados no significativos de 40 $\mu\text{g Cd/g PS}$.

La protección de las metalotioneínas al efecto tóxico del cadmio basado en la síntesis *de novo* de metalotioneínas, depende de la suma neta de influjo de los metales pesados (el influjo menos el eflujo) y en relación a la degradación de las metalotioneínas (revisión en Hogstrand and Haux., 1991). De tal manera los resultados obtenidos en *L. setiferus* en 10 ups sugieren que el aumento de metalotioneínas obedece a una inducción *in situ* o bien y mucho más plausible, sea el resultado del transporte de las metalotioneínas sintetizadas en la branquia al hepatopáncreas; en contraste, en 17 ups el aumento de las metalotioneínas en el hepatopáncreas obedece sólo a su inducción *in situ* dado que no se observó un aumento de su síntesis en la branquia.

Como se mencionó con anterioridad, el incremento en la síntesis de metalotioneínas se correlacionó positivamente con el aumento en la bioacumulación del metal pero sólo en el tejido branquial y en los camarones evaluados en 10 ups. En esta salinidad y en un medio libre del metal, persiste la bioacumulación del cadmio en la branquia y en el hepatopáncreas de los camarones si bien las metalotioneínas se reducen a niveles normales sólo en el hepatopáncreas de los organismos expuestos a 0.10 mg Cd/l. En 17 ups, las metalotioneínas en branquia sólo se recuperaron después de la exposición a 0.10 mg Cd/l aunque permanece elevada la concentración del metal en el tejido; en contraste, a pesar de la reducción del metal bioacumulado en el hepatopáncreas, permanece la inducción en la síntesis de metalotioneínas por la exposición previa a 0.18 mg Cd/l. Estos resultados señalan que en los juveniles de *L. setiferus* la desintoxicación y protección celular al efecto tóxico del cadmio mediante la inducción en la síntesis de metalotioneínas difiere dependiendo de la salinidad del medio externo y por lo tanto de la capacidad osmoreguladora de los camarones. El secuestro del metal por las metalotioneínas y su tasa de síntesis se encuentra a su vez relacionada principalmente al tiempo y nivel de exposición al metal en el agua (revisión en Hosgtrand y Haux, 1991)

En invertebrados bentónicos aparentemente resistentes a la exposición a metales pesados, se ha documentado el enlace del metal a proteínas, pero también presentan una considerable cantidad de gránulos inorgánicos saturados de metales (Levinton, 2000; Legras et al., 2000; Hamza-Chafai et al., 1999; Roesijadi, 1992; Bjerregaard, 1991; 1990). Las metalotioneínas y otras proteínas de elevado peso molecular secuestran el ión metálico disuelto en el citosol de las células o en la hemolinfa (como hemocianina), mientras que la fracción insoluble permanece en los lisosomas o en precipitados minerales insolubles. La participación de ambos mecanismos ha sido observada en *Carcinus maenas* (Legras et al., 2000; Bjerregaard, 1991), *Homarus americanus* y *H. vulgaris*, (Levinton, 2000) *Paelomon marmoratus*, (Legras et al., 2000), si bien se señala que el mecanismo de mayor importancia es la participación de las metalotioneínas.

La persistencia en la bioacumulación del cadmio en contraste a la reducción y recuperación a niveles normales de las metalotioneínas, sugiere que en los juveniles de *L. setiferus* participan conjuntamente otros mecanismos de desintoxicación y protección celular, los cuales están

presentes en mayor grado en branquia que en hepatopáncreas y son más activos en 10 ups que en 17 ups. El control interno de los niveles de cadmio biodisponibles adicional al control de metalotioneínas se corroboró en los camarones calculando la inducción esperada de metalotioneínas asumiendo que la concentración total de cadmio bioacumulado en branquia y en hepatopáncreas se encontraba biodisponible o como ión libre. Los resultados obtenidos denotan que los niveles observados de metalotioneínas principalmente en branquia son significativamente menores que los valores esperados calculados (Anexo IV). Si se considera que existen otros mecanismos involucrados en la desintoxicación de metales y que no se evaluaron en el presente trabajo como son la formación de gránulos inertes, éstos pueden ser en parte responsables de la discrepancia en la proporción de las metalotioneínas observadas-esperadas en *L. setiferus*. De tal manera es posible suponer en los camarones, la formación de gránulos insolubles de cadmio, principalmente en la branquia, contribuyendo a reducir la biodisponibilidad del cadmio y por lo tanto la acción tóxica del metal bioacumulado en los juveniles. Asimismo la reducción en la concentración del metal en el hepatopáncreas en 17 ups y parcialmente en 10 ups (con 0.18 mg Cd/l) en un medio libre de cadmio sugiere su eliminación por heces probablemente asociado a gránulos inertes como ha sido reportado en *Palaemon elegans* expuestos al zinc (White y Rainbow, 1984a; 1984b) y en otros crustáceos por la exposición a diversos metales pesados (Legras et al., 2000)

Las alteraciones observadas en los juveniles de *L. setiferus* por la exposición subletal cadmio en los mecanismos evaluados e involucrados en la regulación iónica y osmótica y en la síntesis de metalotioneínas con relación a la bioacumulación corporal del cadmio, se refleja en el consumo de oxígeno de los camarones.

En los juveniles de *L. setiferus*, la concentración de cadmio acumulado en branquia y hepatopáncreas se relacionó a los procesos de transporte del metal de branquia a hepatopáncreas a través de la hemolinfa y cuya velocidad de transferencia se encuentra determinado por la salinidad, la biodisponibilidad del metal y por la condición fisiológica del organismo, comportamiento descrito en otros crustáceos (Martín y Rainbow, 1998; Rainbow, 1997; Bjerregaard, 1990 y 1991). De acuerdo a Bjerregaard (1991), la mayor acumulación del cadmio en hepatopáncreas que en branquia en juveniles de *Carcinus maenas* como en otros crustáceos, es

reflejo de la capacidad fisiológica de los organismos de compensar y de reducir la toxicidad del metal. Este comportamiento también se observó en los juveniles de *L. setiferus* durante la etapa de exposición al metal. No obstante durante la etapa de recuperación la bioacumulación del cadmio en la branquia fue mayor que en el hepatopáncreas y en particular en los camarones expuestos a 0.18 mg Cd/l en 17 ups, lo cual sugiere un mayor deterioro fisiológico. Lo anterior coincide con la inhibición permanente de la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa y el incremento sostenido en la tasa respiratoria de estos organismos, aún durante la etapa de recuperación en un medio libre de cadmio.

El consumo de oxígeno es una medida indirecta del metabolismo aerobio y reflejo de la producción de energía para cubrir las funciones globales del organismo; por ello se le considera una medida de integración sencilla que da cuenta de la condición fisiológica de los individuos (Fry, 1971). En los juveniles de *L. setiferus* del grupo testigo el consumo de oxígeno fue afectada por el cambio de salinidad, donde la acción del cadmio sobre la tasa metabólica pareció estar enmascarada en la salinidad menor (10 ups) del medio. En los camarones del grupo testigo, la tasa metabólica fue mayor en baja salinidad, condición en la cual los camarones hiperregulan, por lo tanto aumenta la demanda energética del trabajo iónico y osmótico para el mantenimiento estable de su medio interno. Este comportamiento ha sido ampliamente documentado en peneidos osmoreguladores (Rosas et al., 1999; Rosas et al., 1997). La exposición al cadmio ocasionó el incremento en la tasa metabólica expuestos sólo en los camarones a 0.18 mg Cd/l en 17 ups hasta en un 204% manteniéndose elevada en los juveniles en un medio libre del metal. Este incremento coincide a su vez con la inhibición permanente de la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa y se relacionó con la mayor bioacumulación del metal en la branquia. El aumento observado en la tasa metabólica tiene consecuencias importantes, ya que limita el campo de actividad metabólica de los organismos limitando su desempeño fisiológico y disminuyendo la energía útil para otras funciones (Vanegas, 1996).

El efecto del cadmio sobre la tasa respiratoria de los crustáceos es variable; puede inhibir el metabolismo (Thurberg et al., 1973; Depledge, 1984), no modificarlo (Spicer y Weber, 1991) o incrementarlo (Espina y Vanegas, 1996b; Vanegas, 1996). Tales variaciones pueden estar relacionadas con diferentes etapas durante la intoxicación del metal. En una primera etapa,

aumenta la demanda de ATP y en consecuencia la fosforilación oxidativa, incremento considerado como una respuesta adaptativa relacionada con mecanismos compensatorios a la intoxicación al metal. En una segunda etapa de intoxicación severa y/o prolongada disminuye la tasa respiratoria debido a la incapacidad del individuo de responder al incremento de ATP demandado, pudiéndolo llevar incluso a la muerte (Vanegas, 1996; Gaudy, et al. 1991).

El aumento de oxígeno en el consumo de oxígeno observado en los juveniles de *L. setiferus* puede ser consecuencia de las alteraciones globales observadas en el equilibrio iónico y osmótico de los camarones (Na^+ , K^+ , Cl^- , Na^+/K^+ -ATPasa, proteínas) reflejando un aumento en las demandas energéticas para el reestablecimiento de su homeostasis iónica y osmótica. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Pequeux (1995) en los que el incremento en el metabolismo respiratorio en crustáceos se ha relacionado con una mayor demanda energética debido a las alteraciones en el balance iónico y osmótico de los organismos. Asimismo el incremento en la tasa respiratoria puede obedecer a los costos energéticos involucrados en la síntesis de metalotioneínas en branquia y hepatopáncreas como un mecanismo de desintoxicación y protección celular al efecto tóxico del cadmio.

Adicionalmente el aumento en la tasa metabólica en los juveniles de *L. setiferus* expuestos al cadmio puede ser reflejo de la participación de mecanismos de compensación en los procesos respiratorios que demandan gasto energético. En este sentido, el incremento en la ventilación braquial y en la frecuencia cardiaca ha sido reportado en *Carcinus maenas* por la exposición al Cu y Hg (Depledge, 1984); a su vez, al Cd aumenta la tasa de extracción de oxígeno en *Callinectes similis* (Ramírez et al., 1989).

Los resultados obtenidos en el presente estudio denotan el efecto adverso del cadmio sobre la regulación iónica y osmótica en los juveniles de *L. setiferus* y cuyo efecto tóxico se relaciona con la capacidad osmoreguladora de los camarones. El hecho de que en 10 ups los camarones presente una mayor capacidad fisiológica para contrarrestar la acción tóxica del metal, sugiere que su condición de hiperregulación le confiere una preadaptación que le permite minimizar la toxicidad del metal debido a una mayor activación de los mecanismos de desintoxicación y protección celular. En contraste en 17 ups, salinidad en la cual los camarones están en una condición de

isosmoticidad, la exposición al cadmio ocasiona la hiperregulación de su medio interno y por lo tanto es posible suponer la limitación de su potencial bioquímico y/o fisiológico para desplegar eficientemente los mecanismos de desintoxicación y protección celular al efecto tóxico de cadmio.

5. CONCLUSIONES

- La regulación iónica y osmótica de los juveniles de *L. setiferus* es alterada por la exposición de 5 días a las concentraciones subletales del cadmio (0.10 y 0.18 mg Cd/l). Sin embargo la capacidad osmoreguladora se recupera rápidamente en un medio libre del metal.
- La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial es inhibida rápidamente por el cadmio. En 17 ups, el efecto del metal sobre la enzima es concentración-dependiente a una salinidad de 17 ups y el efecto es irreversible a altas concentraciones. La inhibición permanente de la enzima se relacionó con la elevada bioacumulación del metal en el tejido. En 10 ups el efecto es tiempo-dependiente y es reversible a mediano plazo.
- La ionoregulación del Na^+ , K^+ y Cl^- es alterada de manera diferencial por la exposición al cadmio. En ambas salinidades, los niveles de Na^+ en hemolinfa son modificados sólo por la exposición a 0.18 mg Cd/l; en contraste, el K^+ es alterado solamente en 17 ups y en la mayor concentración de cadmio. El Cl^- es afectado de manera concentración-dependiente por el cadmio en ambas salinidades; en 17 ups el Cl^- fue modificado por la exposición subletal a 0.10 y 0.18 mg Cd/l, mientras que en 10 ups sólo fue alterado en la mayor concentración del metal. No obstante, la regulación iónica del Na^+ , K^+ y Cl^- se recuperan en un medio libre del metal y procede de manera más rápida para los iones Na^+ y K^+ .
- En particular, las modificaciones observadas en la regulación iónica del Na^+ y K^+ no se relacionaron directamente con la alteración observada en la actividad enzimática de la Na^+/K^+ -ATPasa branquial.
- La exposición al cadmio ocasionó una pequeña pero significativa deshidratación solamente en los camarones evaluados en 10 ups.
- Los niveles de proteína total en hemolinfa se incrementan en presencia del cadmio en ambas salinidades y se relacionaron con el cadmio acumulado en la branquia y el hepatopáncreas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta relación sugiere una rápida transferencia del metal de la branquia al hepatopáncreas, mayor en baja salinidad y por la exposición a 0.18 mg Cd/l.

- Durante la exposición al metal, la bioacumulación del cadmio es mayor en el hepatopáncreas que en la branquia de los camarones en ambas salinidades. No obstante, la acumulación del cadmio en la branquia es mayor en 17 ups que en 10 ups. En un medio libre del metal la tasa de eliminación del cadmio es mayor en hepatopáncreas que en branquia, principalmente en bajas concentraciones y en 10 ups.
- En ambas salinidades, la inducción de metalotioneínas es mayor en la branquia que en el hepatopáncreas de *L. setiferus*, pero su síntesis se relacionó con la bioacumulación del metal sólo en los camarones expuestos al cadmio en 10 ups. En un medio libre del metal la reducción de las metalotioneínas es mayor en el hepatopáncreas de los camarones en ambas salinidades.
- La relación entre las metalotioneínas en la branquia y en el hepatopáncreas con el incremento en las proteínas en la hemolinfa sugiere que la transferencia del metal de la branquia al hepatopáncreas a través de la hemolinfa ocurre fundamentalmente por el enlace del cadmio a las metalotioneínas.
- La persistencia del cadmio bioacumulado en un medio libre del metal en contraste a la recuperación en la regulación iónica y osmótica de los camarones, sugiere la participación de otros mecanismos de desintoxicación y protección celular al efecto tóxico del metal.
- El consumo de oxígeno se incrementó solo en los camarones evaluados en 17 ups y expuestos a la mayor concentración de cadmio, incremento que se mantuvo en la etapa de recuperación. Este aumento se relacionó con la mayor acumulación del metal en la branquia y puede ser consecuencia de la participación de mecanismos compensatorios para reducir la acción tóxica del metal.

- La recuperación en la capacidad osmoreguladora de los juveniles de *L. setiferus* es reflejo de la participación de diversos mecanismos de compensación y desintoxicación al cadmio que demandan un gasto energético alto para mantener la homeostasis de su medio interno.

6. RECOMENDACIONES

- Dado que los niveles de Cl^- en la hemolinfa de los camarones se relaciona con la actividad de la anhidrasa carbónica en branquia, es necesario evaluar el posible efecto del cadmio sobre esta enzima.
- La alta acumulación final de cadmio en la branquia y no en el hepatopáncreas, sugiere la participación de mecanismos de desintoxicación adicionales al de las metalotioneínas, posiblemente por unión del metal a gránulos insolubles principalmente en branquia. De tal manera es necesario en futuras evaluaciones cuantificar la acumulación del metal en estos tejidos considerando dos fases: la soluble (Cd-MT ó Cd-proteínas) y la insoluble o sólida (Cd-gránulos minerales).

- La recuperación en la capacidad osmoreguladora de los juveniles de *L. setiferus* es reflejo de la participación de diversos mecanismos de compensación y desintoxicación al cadmio que demandan un gasto energético alto para mantener la homeostasis de su medio interno.

6. RECOMENDACIONES

- Dado que los niveles de Cl^- en la hemolinfa de los camarones se relaciona con la actividad de la anhidrasa carbónica en branquia, es necesario evaluar el posible efecto del cadmio sobre esta enzima.
- La alta acumulación final de cadmio en la branquia y no en el hepatopáncreas, sugiere la participación de mecanismos de desintoxicación adicionales al de las metalotioneínas, posiblemente por unión del metal a gránulos insolubles principalmente en branquia. De tal manera es necesario en futuras evaluaciones cuantificar la acumulación del metal en estos tejidos considerando dos fases: la soluble (Cd-MT ó Cd-proteínas) y la insoluble o sólida (Cd-gránulos minerales).

7. ANEXOS

I. CORRECCIÓN POR DILUCIÓN DE LA HEMOLINFA.

Tanto la presión osmótica como los iones mayoritarios (Na^+ , K^+ y Cl^-) del medio interno de los camarones, se evaluaron en muestras de hemolinfa con una dilución en proporción 1:10. A fin de efectuar las correcciones adecuadas por la dilución realizada y garantizar que los valores observados fueran similares a los esperados, se procedió a lo siguiente.

Se evaluó la presión osmótica directa (sin dilución) de diferentes soluciones de concentraciones conocidas de Na^+ , K^+ y Cl^- (NaCl y KCl ; SIGMA, grado analítico) correspondientes a un intervalo de salinidades aproximado de 5 a 35 ups; submuestras de cada una se diluyeron en proporción 1:10 (Tabla 1). Los resultados fueron graficados y se realizó la regresión lineal en tre los valores de la presión osmótica de las muestras con y sin dilución (Figura 1), obteniéndose la ecuación:

$$Y = 0.105X - 3.234 \quad (p > 0.05; R^2 = 0.99)$$

donde "Y" y "X" corresponden a la presión osmótica de muestras con dilución y sin dilución respectivamente. La ecuación obtenida se utilizó para recalcular los resultados obtenidos durante los bioensayos.

Tabla 1 Presión osmótica de una solución de concentraciones conocidas de Na^+ , K^+ y Cl^- (300 mM NaCl y 11 mM KCl) en muestras sin dilución (PO directa) y con dilución 1:10 (PO 1:10)

mMol/l			mOsm/Kg	
Na^+	K^+	Cl^-	PO Dir.	PO 1:10
300	11	311	597	60
			597	60
280	10.27	290.27	558	55
			555	56
260	9.53	269.53	519	52
			516	50
240	8.8	248.8	476	45
			478	47
220	8.07	228.07	437	43
			437	43
200	7.33	207.33	406	39
			404	39
180	6.6	186.6	361	36
			363	35

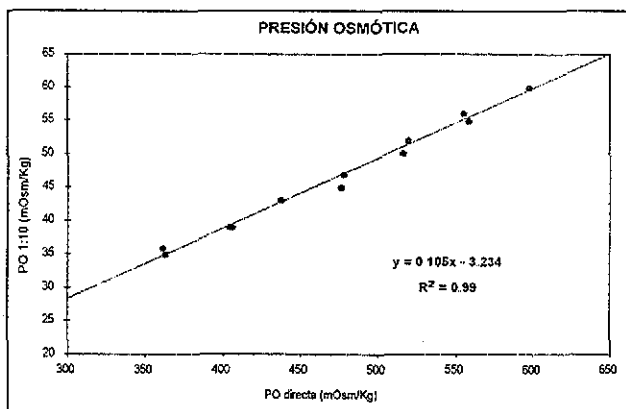


Figura 1. Relación entre la PO (mOsm/Kg) de una solución de concentraciones conocidas de Na^+ , K^+ y Cl^- en muestras evaluadas sin dilución (PO directa) y con dilución (PO 1:10)

Para comprobar que la ecuación utilizada fuera la adecuada, se realizó la medición directa de la presión osmótica de la hemolinfa de los camarones evaluados en 17 ups al momento de su extracción y esa misma muestra se diluyó en proporción 1:10 y se le midió nuevamente la presión osmótica (Tabla 2).

Los resultados obtenidos de la muestra diluida fueron corregidos por la ecuación obtenida anteriormente. Los valores corregidos se compararon con los obtenidos por la medición directa (t Student; $\alpha=0.05$) no obteniéndose diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$) garantizando así que el procedimiento seguido para efectuar la corrección de la presión osmótica por la dilución realizada en la hemolinfa de los camarones fue la adecuada.

Tabla 2. Presión osmótica (mOsm/Kg) de la hemolinfa de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en muestras con una dilución en proporción 1:10 (PO 1:10) y sin dilución (PO directa). Se incluyen valores promedio de cada grupo y en paréntesis su error estándar.

HEMOLINFA DILUIDA mOsm/Kg					HEMOLINFA SIN DILUCIÓN mOsm/Kg				
I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
57	58	53	47	53	654	576	508	525	535
57	55	60	48	59	626	584	595	524	505
51	ND	56	58	ND	531	595	532	420	573
57	40	56	56	56	593	528	557	618	616
52	40	55	54	ND	536	557	562	591	340
52	66	54	52	60	ND	534	ND	609	597
54	53	57	50	59	642	586	ND	579	ND
54	62	47	53	58	584	588	615	ND	501
54	53	51	45	51	611	561	556	465	590
ND	58	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
					597.13 (16.12)	567.67 (8.08)	560.71 (13.57)	541.38 (25.15)	532.38 (31.34)

ND: No determinada.

Tabla 3. valores corregidos de la presión osmótica de la hemolinfa de submuestras de *L. setiferus* por la dilución 1:10 efectuada mediante la ecuación $Y= 0.105X - 3.23$. Se incluyen valores promedio de cada grupo y en paréntesis su error estándar.

1	2	3	4	5
572.57	582.08	534.55	477.51	534.55
572.57	553.56	601.09	487.02	591.58
515.54	ND	563.06	582.08	ND
572.57	410.97	563.06	563.06	563.06
525.04	410.97	553.56	544.05	ND
525.04	658.12	544.05	525.04	601.09
544.05	534.55	572.57	506.03	591.58
544.05	620.10	477.51	534.55	582.08
544.05	534.55	515.54	458.50	515.54
ND	582.08	ND	ND	ND
546.43 (8.37)	543.00 (28.23)	545.24 (13.25)	519.76 (13.64)	568.50 (12.23)

ND: No determinada.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

El procedimiento señalado con anterioridad se utilizó asimismo para efectuar las correcciones adecuadas de las concentraciones de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- evaluados en las muestras de hemolinfa diluidas en proporción 1:10. las ecuaciones obtenidas para cada ión fueron:

$$\text{Na}^+ : Y = 0.105X - 1.648 \quad (R^2 = 0.97)$$

$$\text{K}^+ : Y = 0.105X + 0.312 \quad (R^2 = 0.82)$$

$$\text{Cl}^- : Y = 0.098X - 0.179 \quad (R^2 = 0.97)$$

donde "Y" y "X" corresponden a las concentraciones respectivas de cada ión (mMol/l) en muestras de hemolinfa con dilución 1:10 y sin diluir (evaluadas directamente), respectivamente. En todos los casos, las regresiones lineales fueron significativas ($p < 0.05$).

II. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ATPasas TOTALES Y Mg^{+2} ATPasa EN BRANQUIA

Tabla 1. Actividad enzimática de la ATPasa Total (μ Mol Pi/mg proteína/h) en las branquias de los juveniles de *L. setiferus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	ATPasa Total μ Mol Pi/mg proteína/h	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	ATPasa Total μ Mol Pi/mg proteína/h	n
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	3.137 ± 0.322 ^a	3	10 ²	Testigo ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	0	23.83 ± 1.46 ^a	2
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	4.313 ± 0.626 ^a	2			RECUPERACIÓN ^{Aa2}	24	26.34 ± 2.11 ^a	4
	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	4.169 ± 0.255 ^a	4		0.10 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	120	39.63 ± 1.68 ^b	3
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	4.594 ± 0.152 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{Ba2}	24	35.44 ± 3.88 ^b	4
17 ¹	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	3.876 ± 0.502 ^a	4	10 ²	0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	168	25.77 ± 0.49 ^a	2
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	0	3.137 ± 0.322 ^a	3			EXPOSICIÓN ^{Ba2}	0	23.83 ± 1.46 ^a	2
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	20.460 ± 0.523 ^b	5		0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	21.42 ± 1.09 ^a	6
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	23.659 ± 3.427 ^b	5			RECUPERACIÓN ^{Ba2}	72	28.71 ± 3.75 ^a	4
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	15.235 ± 0.597 ^b	4	10 ²	0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	120	42.83 ± 1.51 ^b	5
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	17.874 ± 0.913 ^b	3			RECUPERACIÓN ^{Ba2}	24	32.68 ± 1.51 ^a	4
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	15.270 ± 2.675 ^b	4		0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	34.97 ± 3.04 ^b	2
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	16.421 ± 2.499 ^b	3			RECUPERACIÓN ^{Ba2}	168	24.91 ± 1.87 ^a	5
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	3.137 ± 0.322 ^a	3	10 ²	0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	0	23.83 ± 1.46 ^a	2
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	18.376 ± 0.420 ^b	5			RECUPERACIÓN ^{Ba2}	24	26.67 ± 2.17 ^a	3
	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	18.766 ± 1.839 ^b	4		0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	35.26 ± 2.03 ^b	4
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	120	10.609 ± 1.311 ^a	4			RECUPERACIÓN ^{Ba2}	120	18.68 ± 1.21 ^b	3
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	15.519 ± 3.071 ^b	4	0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	18.07 ± 0.91 ^b	2	
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	21.459 ± 1.611 ^b	3		RECUPERACIÓN ^{Ba2}	72	31.25 ± 1.61 ^a	6	
17 ¹	0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	168	16.142 ± 4.706 ^b	3	0.18 ^{A2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	168	31.80 ± 2.63 ^a	4	
		RECUPERACIÓN ^{Ba1}					RECUPERACIÓN ^{Ba2}				

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

Tabla 2. Actividad enzimática de la $Mg^{+2}/ATPasa$ ($\mu\text{Mol Pi/mg proteína/h}$) en la branquia de los juveniles de *L. seiferrus* evaluados en dos salinidades (ups) y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h. Se incluyen valores promedio y error estándar.

ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	$Mg^{+2}/ATPasa$ $\mu\text{Mol Pi/mg}$ proteína/h	n	ups	TRATAMIENTO mg Cd/l	ETAPA	TIEMPO h	$Mg^{+2}/ATPasa$ $\mu\text{Mol Pi/mg}$ proteína/h	n
17 ¹	Testigo ^{A1}	EXPOSICIÓN ^{Aa1}	0	2.951 ± 1.264 ^a	3	Testigo ^{AC2}	EXPOSICIÓN ^{Aa2}	0	15.63 ± 3.17 ^a	2	
		EXPOSICIÓN ^{Aa1}	24	2.020 ± 0.503 ^a	2		EXPOSICIÓN ^{Aa2}	24	16.33 ± 2.36 ^a	4	
		EXPOSICIÓN ^{Aa1}	120	2.655 ± 0.312 ^a	4		EXPOSICIÓN ^{Aa2}	120	25.11 ± 1.71 ^a	3	
		RECUPERACIÓN ^{Aa1}	24	2.708 ± 0.173 ^a	4		RECUPERACIÓN ^{Aa2}	24	14.20 ± 4.75 ^a	4	
	RECUPERACIÓN ^{Aa1}	168	2.091 ± 0.521 ^a	4	RECUPERACIÓN ^{Aa2}	168	17.05 ± 2.27 ^a	2			
	0.10 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	2.951 ± 1.264 ^a	3	0.10 ^{B2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	0	15.63 ± 3.17 ^a	2
			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	15.290 ± 0.411 ^b	5		EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	13.91 ± 1.11 ^a	6
			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	18.554 ± 3.511 ^b	5		EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	20.29 ± 4.20 ^a	4
			EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	10.195 ± 0.704 ^a	4		EXPOSICIÓN ^{Ba2}	120	37.92 ± 0.82 ^b	5
	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	12.447 ± 1.088 ^b	3	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	24	27.24 ± 2.06 ^a	4			
	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	10.460 ± 2.345 ^a	4	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	72	23.36 ± 1.36 ^a	2			
	RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	9.365 ± 2.496 ^a	3	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	168	13.64 ± 1.56 ^a	5			
0.18 ^{B1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	EXPOSICIÓN ^{Ba1}	0	2.951 ± 1.264 ^a	3	0.18 ^{CB2}	EXPOSICIÓN ^{Ba2}	0	15.63 ± 3.17 ^a	2	
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	24	12.081 ± 0.793 ^b	5		EXPOSICIÓN ^{Ba2}	24	16.11 ± 2.11 ^a	3	
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	72	14.410 ± 1.957 ^b	4		EXPOSICIÓN ^{Ba2}	72	21.84 ± 2.30 ^a	4	
		EXPOSICIÓN ^{Ba1}	120	6.783 ± 1.121 ^a	4		EXPOSICIÓN ^{Ba2}	120	16.41 ± 1.89 ^a	3	
RECUPERACIÓN ^{Ba1}	24	12.446 ± 3.123 ^b	4	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	24	11.20 ± 1.09 ^a	2				
RECUPERACIÓN ^{Ba1}	72	18.190 ± 1.392 ^b	3	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	72	23.31 ± 1.63 ^a	6				
RECUPERACIÓN ^{Ba1}	168	12.586 ± 4.765 ^b	3	RECUPERACIÓN ^{Ba2}	168	19.19 ± 2.14 ^a	4				

Letras mayúsculas diferentes entre tratamientos y entre etapas similares (columnas) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Letras minúsculas diferentes al interior de cada tratamiento (exposición-recuperación; tiempos) denotan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Números diferentes denotan diferencias significativas entre salinidades (filas), por tratamientos y por etapas.

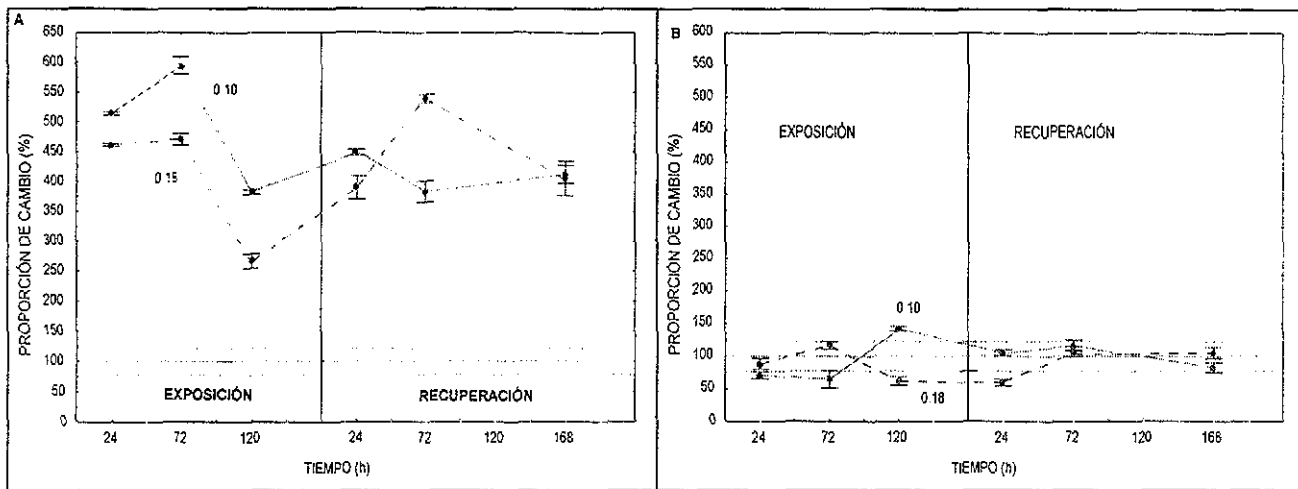


Figura 1. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la actividad de la ATPasa Total en branquia de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

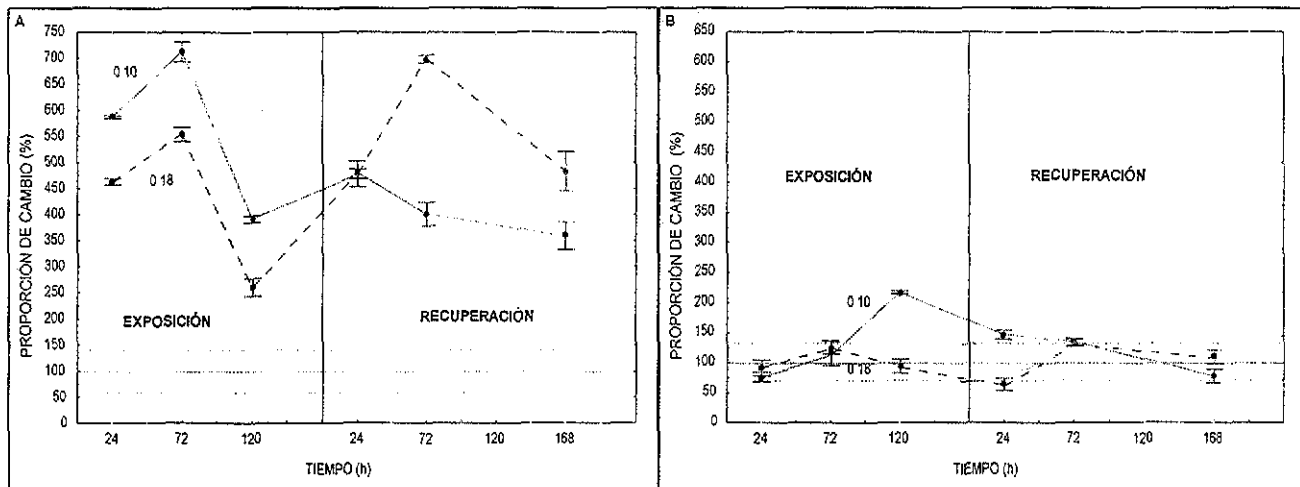


Figura 2. Proporción de cambio respecto al grupo testigo (%) de la actividad de la Mg²⁺ ATPasa en branquia de *L. setiferus* expuestos durante 120 h a 0.10 y 0.18 mg Cd/l y durante 168 h de recuperación al cadmio a una salinidad de 17 ups (A) y 10 ups (B). El grupo testigo es considerado el 100 % (promedio \pm ES; líneas punteadas).

III.

Parámetros de las regresiones lineales que describen la relación entre diferentes respuestas evaluadas en branquia y hepatopáncreas de los juveniles de *L. setiferus* evaluados a 17 y 10 ups y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120h y colocados en recuperación al metal por 168h. Ac. Acumulación; Tp. Tiempo; MT metalotioneínas, Activ. actividad Na^+/K^+ -ATPasa; Pr. proteína en hemolinfa; exp Exposición; rec. recuperación.

17 ups	BRANQUIA			HEPATOPANCREAS		
	0.10 mg Cd/l	Pendiente (m)	Intercepto	R ²	Pendiente (m)	Intercepto
Ac. vs Tp (exp)	1.19 ^a	25.64	0.99	1.80 ^a	-11.97	0.97
Ac. vs Tp (rec)	-0.25	177.6	0.94	-0.70	193.39	0.78
MT vs Tp (exp)	0.001 ^a	0.383	0.23	0.0002 ^a	0.16	0.24
MT vs Tp (rec)	-0.003	0.61	0.77	-0.00004	0.14	0.33
Ac. vs MT (exp)	0.001	0.341	0.30	0.0001	0.166	0.26
Ac. vs MT (rec)	0.0147	-1.96	0.95	0.0001	0.123	0.84
Ac. vs Activ (exp)	-0.006	5.93	0.76			
Ac. vs Activ (rec)	-0.034	11.09	0.58			
Ac. vs Prot. (exp)	0.46	63.09	0.99	0.289	77.80	0.98
Ac. vs Prot. (rec)	0.91	-49.66	0.79	0.42	39.36	0.95
0.18 mg Cd/l						
Ac. vs Tp (exp)	2.24 ^a	46.64	0.94	3.98 ^a	-25.16	0.99
Ac. vs Tp (rec)	-0.21	390.5	0.99	-1.97	418.61	0.92
MT vs Tp (exp)	0.002 ^a	0.20	0.53	0.002 ^a	0.25	0.60
MT vs Tp (rec)	.0004	0.19	0.96	0.0004	0.37	0.98
Ac. vs MT (exp)	0.001	0.19	0.44	0.0004	0.282	0.44
Ac. vs MT (rec)	-0.016	6.59	0.92	-0.0002	0.456	0.98
Ac. vs Activ (exp)	-0.007	5.86	0.89			
Ac. vs Activ (rec)	-0.016	9.07	0.99			
Ac. vs Prot. (exp)	0.093	74.26	0.98	0.062	88.6	0.56
Ac. vs Prot. (rec)	0.044	-88.62	0.48	0.066	63.14	0.62
10 ups						
BRANQUIA			HEPATOPÁNCREAS			
0.10 mg Cd/l	Pendiente (m)	Intercepto	R ²	Pendiente (m)	Intercepto	R ²
Ac. vs Tp (exp)	2.12 ^b	20.36	0.98	1.40 ^a	3.63	0.98
Ac. vs Tp (rec)	0.13	230.20	0.57	-0.13	214.78	0.91
MT vs Tp (exp)	0.003 ^a	0.32	0.77	0.001 ^a	0.21	0.50
MT vs Tp (rec)	-0.006	0.82	0.99	-0.001	0.33	0.56
Ac. vs MT (exp)	0.001	0.295	0.75	0.001	0.22	0.42
Ac. vs MT (rec)	-0.009	2.59	0.99	0.010	-1.70	0.85
Ac. vs Activ (exp)	-0.015	11.05	0.78			
Ac. vs Activ (rec)	0.139	9.07	0.97			
Ac. vs Prot. (exp)	0.091	67.35	0.91	0.137	68.99	0.91
Ac. vs Prot. (rec)	-0.719	253.32	0.81	1.029	129.80	0.72
0.18 mg Cd/l						
Ac. vs Tp (exp)	2.30 ^a	74.90	0.92	5.02 ^a	-57.42	0.96
Ac. vs Tp (rec)	-0.54	341.12	0.98	-0.23	283.0	0.97
MT vs Tp (exp)	0.007 ^a	0.08	0.95	0.00001 ^a	0.20	0.17
MT vs Tp (rec)	0.0002	0.36	0.24	0.0003	0.22	0.46
Ac. vs MT (exp)	0.002	-0.027	0.84	-0.0001	0.22	0.22
Ac. vs MT (rec)	-0.001	0.56	0.41	-0.002	0.64	0.65
Ac. vs Activ (exp)	-0.019	12.82	0.95			
Ac. vs Activ (rec)	-0.065	27.35	0.99			
Ac. vs Prot. (exp)	0.282	53.59	0.98	0.110	86.29	0.80
Ac. vs Prot. (rec)	0.021	68.87	0.10	0.026	68.08	0.05

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. CONCENTRACIÓN ESPERADA DE METALOTIONEINAS

Concentración de Metalotioneínas esperada ($\mu\text{g MT/mg PS}$) en relación a la concentración de cadmio cuantificado en la branquia y el hepatopáncreas de los juveniles de *L. setiferus* evaluados a 17 y 10 ups y expuestos a 0.10 y 0.18 mg Cd/l por 120 h y colocados en recuperación al metal por 168 h.

	17 ups			10 ups		
	EXPOSICIÓN	BRANQUIA $\mu\text{g MT/mg PS}$	HEPATOPÁNCREAS $\mu\text{g MT/mg PS}$	EXPOSICIÓN	BRANQUIA $\mu\text{g MT/mg PS}$	HEPATOPÁNCREAS $\mu\text{g MT/mg PS}$
Testigo	0	0.037 \pm 0.005	0.032 \pm 0.002	0	0.048 \pm 0.010	0.039 \pm 0.003
	24	0.049 \pm 0.012	0.038 \pm 0.004	24	0.085 \pm 0.002	0.030 \pm 0.003
0.10	120	0.098 \pm 0.009	0.120 \pm 0.003	120	0.068 \pm 0.017	0.038 \pm 0.005
	24	0.109 \pm 0.021	0.041 \pm 0.002	24	0.079 \pm 0.021	0.043 \pm 0.005
0.18	168	0.082 \pm 0.013	0.027 \pm 0.001	168	0.047 \pm 0.026	0.037 \pm 0.002
	0	0.037 \pm 0.005	0.032 \pm 0.002	0	0.048 \pm 0.010	0.039 \pm 0.003
0.10	24	0.096 \pm 0.009	0.102 \pm 0.014	24	0.177 \pm 0.041	0.205 \pm 0.075
	72	0.164 \pm 0.038	0.242 \pm 0.061	72	0.359 \pm 0.063	0.293 \pm 0.044
0.18	120	0.316 \pm 0.049	0.715 \pm 0.062	120	0.581 \pm 0.099	0.952 \pm 0.073
	24	0.309 \pm 0.075	1.030 \pm 0.107	24	0.520 \pm 0.019	0.989 \pm 0.039
0.18	72	0.321 \pm 0.078	0.412 \pm 0.052	72	0.905 \pm 0.153	0.917 \pm 0.053
	168	0.315 \pm 0.027	0.365 \pm 0.026	168	0.832 \pm 0.097	0.620 \pm 0.068
0.18	0	0.037 \pm 0.005	0.032 \pm 0.002	0	0.048 \pm 0.010	0.039 \pm 0.003
	24	0.273 \pm 0.073	0.159 \pm 0.025	24	0.340 \pm 0.070	0.558 \pm 0.414
0.18	72	0.484 \pm 0.197	0.798 \pm 0.186	72	1.001 \pm 0.132	0.778 \pm 0.195
	120	0.626 \pm 0.198	1.672 \pm 0.229	120	1.373 \pm 0.250	0.856 \pm 0.260
0.18	24	0.830 \pm 0.148	1.446 \pm 0.265	24	0.969 \pm 0.144	1.056 \pm 0.165
	72	0.702 \pm 0.061	0.956 \pm 0.050	72	1.425 \pm 0.335	1.558 \pm 0.123
0.18	168	0.898 \pm 0.346	0.537 \pm 0.070	168	1.187 \pm 0.304	0.015 \pm 0.125

$$\mu\text{g MT/mg PS} = [(\mu\text{g Cd/mg PS})_m - (\mu\text{g Cd/mg PS})_b] * Fd * 17.8 / \text{mg PH}_m$$

donde: m = muestra del tejido, branquia o hepatopáncreas

Fd = factor de dilución

b = blanco

17.8 = constante de estabilidad del enlace Cd-MT (George, 2001)

8. BIBLIOGRAFÍA

Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Meth. Enzym.* 8: 115-118.

Bambang, Yulianto; G. Charmantier ; P. Thuét y J.P. Trilles. 1995. Effect of cadmium on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Biol.* 123: 443-450.

Bjerregaard, P. 1990. Influence of physiological condition on cadmium transport from haemolymph to hepatopancreas in *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 106: 199-209.

Bjerregaard, P. 1991. Relationship between physiological condition cadmium accumulation in *Carcinus maenas* (L.) *Comp. Biochem. Physiol.* A(99): 75-83.

Blanco, G and R. W. Mercer. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 44): F633-F650.

Botello, Alfonso V.; G.P. Vélez; A. Toledo; G. Díaz-González y S. Villanueva. 1992. Ecología, recursos costeros y contaminación en el Golfo de México. *Ciencia y Desarrollo.* 17: 28-48.

Butler, Alison. 1998. Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. *Science*, Vol. 281: 207-209.

Castille, F.L. and A.L. Lawrence. 1981(a). A comparison of the capabilities of juvenile and adult *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris* to regulate the osmotic, sodium and chlorine concentrations in the hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* A 68:677-680

Castille, F.L. and A.L. Lawrence. 1981(b). The effect of salinity on the osmotic, sodium and chlorine concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol.* A 68: 75-80.

Celso, Dias and A. Bainy. 2000. Biochemical in penaeids contaminants. *Aquaculture* 191: 163-168.

Charmantier, Guy. 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Invert. Rep. Devel.* 33(2-3): 177-190

Depledge, M.H. 1984. Disrupcion of circulatory and respiratory activity in shore crabs (*Carcinus maenas* L.) exposed to heavy metal pollution. *Comp. Biochem. Physiol.* 78C (2): 445-459.

Dhavale, D.; V.B. Masurekar and B.A. Giridhar. 1988. Cadmium induced inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity in tissues of crab *Scylla serrata* (Forsk.) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40: 759-763.

- Dunbar, Lisa A. and Michael J. Caplan. 2001. Ion pumps in polarized cells: Sorting and regulation of the Na⁺, K⁺ and H⁺, K⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* 276(32): 29617-29620.
- Espina, S. y C. Vanegas. 1996a. Ecofisiología y contaminación. P. 45-68. In: Botello, Alfonso V.; Rojas G.,J.L.; Benítez, J.A. y Zárata, L.D. 1996. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. *EPOMEX, Serie científica* 5. Universidad Autónoma de Campeche. p.p. 666.
- Espina, S. y C. Vanegas. 1996b. Ecotoxicología y contaminación. P. 69-106. In: Botello, Alfonso V.; Rojas G.,J.L.; Benítez, J.A. y Zárata, L.D. 1996. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. *EPOMEX, Serie científica* 5. Universidad Autónoma de Campeche. P.p. 666.
- Ferraris R.P.; F.D. Parado-Esteba; J.M. Ladja and E.G. De Jesús. 1986. Effect of salinity on the osmotic , chloride, total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). *Comp. Biochem. Physiol* 83A (4): 701-708.
- Fry, F. E. 1971. *The effect of environmental factors on the physiology of fish.* p. 1-98.
- Gaudy, R.; J.P. Guérin and P. Kerambrum. 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomyis lingvura* (Crustacea: Mysidacea). *Mar. Biol* 109: 493-501.
- George, S. and L.. M.García. *Molecular tools in ecotoxicology research and environmental impact assessment.* Curso realizado en el CIAD de Mazatlán, Sinaloa.
- Giesy J.P.; J.P. Bowling and H.J. Kania. 1980. Cadmium and zinc accumulation by freshwater crayfish. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 9: 683-697.
- Gracia, A. 1989. *Ecología y pesquería del camarón blanco Penaeus setiferus (Linnaeus, 1967) en la Laguna de Términos-Sonda de Campeche.* Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. 127 p.p.
- Guerin, J.L.; B. Stickle. 1995. Effects of cadmium on survival, osmoregulatory ability and bioenergetics of juvenile blue crab *Callinectes sapidus* at different salinities. *Mar. Environ. Res.* 40: 227-246.
- Hamza-Chaffair, A.; J.C. Amiard and R.P. Cosson. 1999. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non.linear model using Box-Cox transformation. *Comp Biochem. Physiol.* 123C (2): 153-163.
- Hebel, D.K.; M.B. Jones and M.H. Deplege. 1997. Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. *Est. Coastal. Shelf. Sci.* 44: 177-184.
- Hogstrand, C. and C. Haux. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 100C (1/2): 137-141.

IMP. 2001. *Informe técnico*.

Jones, M.B. 1975. Synergistic effects of salinity, temperature and heavy metals on mortality and osmoregulation in marine and estuarine isopods (Crustacea). *Mar. Biol.*, 30: 13-20.

Klaassen, C.D.; J. Liu and S. Choudhuri. 1999. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 267-294.

Legras, S.; C. Mouneyrac; J.C. Amiard; C. Amiard-Triquet and P.S. Rainbow. 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246: 259-279.

Lehninger, A.; D. Nelson y M. Cox. 1993. *Principles of biochemistry*. 2 ed. Edit. Worth Publishers. N.Y. p.p. 268-297.

Levinton, J. 2000. Evolution in metal-contaminated environments. *Comp. Biochem. Physiol.* Part A supplement 1, 126:93

Lignot, J.H., C. Spanings-Pierrot and G. Charmantier. 2000. Osmoregulatory capacity as tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191:209-245.

Lignot, J.H.; J.C. Cochard; C. Soyeux; P. Lemaire and G. Charmantier. 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*. 170: 79-92.

Lingrel, J.B. and T. Kuntzweiler. 1994. Na^+, K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 269(31):19659-19662.

Lionetto, M.G.; M.E. Giordano; S. Vilella and T. Schettino. 2000. Inhibition of enzymatic activities by cadmium. *Aqu. Tox.* 48: 561-571.

Luco, C. and G. Flik. 1999. Na^+/K^+ -ATPase and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am. J. Physiol.* 276 (regulatory Integrative comp., *physiol.* 45): R490-R499.

Lucu, C. 1990. Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 97 A(3): 297-306.

Martin, D.S. and P.S. Rainbow. 1998. The kinetics of zinc and cadmium in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Aqua. Tox.* 40: 203-231.

Martínez, M.; A. Torreblanca; J. Ramo; A. Pastor and J. Díaz-Mayas. 1993. Cadmium induced metallothionein in hepatopáncreas of *Procambarus clarkii*: quantification by a silver saturation method. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 105 C(2): 263-267.

- Mc Farland, W.N. and B.D. Lee. 1963. Osmotic and ionic concentration of shrimp of the Texas coast. *Bull. Mar. Sci.* 13: 391-416.
- Moilanen, Lori H.; T. Fukushige and J.H. Freedman. 1999. Regulation of metallothionein gene transcripcion. Identification of upstream regulatory elements and transcripcion factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, (274)42: 29655-29665.
- NOM-001-ECO -1996. Limites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales y bienes nacionales.
- Newman, C. and Ch. Jagoe. 1996 *Ecotoxicology*. A hierarchical treatment. Edit. CRC Press, USA p 411.
- Onosaka, S. and M.G. Cherian. (1982). Comparasion of metallothionein determination by polarographic and cadmium saturation methods. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63: 270-274.
- Páez-Osuna, F. 1996. Fuentes de metales en la zona costera marina. In: Botello, Alfonso V.; Rojas G.,J.L.; Benítez, J.A. y Zárata, L.D. 1996. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. *EPOMEX, Serie científica 5*. Universidad Autónoma de Campeche. p.p. 666.
- Papathanassiou, E. 1985. Effects of cadmium ions on the ultraestructure of the gills cells of the brown shrimp *Crangon crangon* (L.) (Decapoda, Caridea). *Crustaceana*. 48 (1):6-17.
- Pedemonte, C.H.; T.A. Pressley, M.F. Lokhandwala and A.R. Cinelli. 1997. regulation of Na,K-ATPase transport activity by protein kinase C. *J. Membrane Biol.* 155: 219-227.
- Perdersen, S.N.; A.-K. Lundebye and M.H. depledge. 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aqua. Tox.* 37: 183-200.
- Péqueux, A.; R. Gilles and L. Bolis. 1984. Osmoregulation in estuarine and marine animals. In: *lecture notes on coastal and estuarine studies No 9*. Edit. Springer-Verlag, Berlin. p.p: 145-170
- Péqueux, André. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15(1): 1-60.
- Ponce-Vélez, G. y A. Botello. 1991. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la Laguna de Términos, Campeche. *Hidrobiología*. 1(2): 1-10.
- Postel, U.; G. Petrusch; S. Riestenpatt; D. Weihrauch; J. Malykh; W. Becker., and D. Siebers. 1998. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPasa and of active ion-transport functions in the gills of the shore crab *Carcinus maenas* induced by cadmium. *Mar. Biol.* 130: 407-416.
- Rainbow, P.S. 1997. Ecofisiology of trace metal uptake in crustaceans. *Est. Coast. Shelf Sci.* 44: 169-175.

- Ramirez, P.; G. Barrera and C. Rosas. 1989. Effects of chromium and cadmium upon respiration and survival of *Callinectes similis*. *Bull. Environm. Toxicol. Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation. N.Y. 666 pp.
- Regnault, M. 1987. Nitrogen excretion in marine and fresh water crustacea. *Biol. Rev.* 62:1-24.
- Rios Torres, H.E. 2001. *Efecto del amonio en la osmoregulación de juveniles de Litopenaeus setiferus (Crustacea, Decapoda)*. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. 70 pp.
- Rodríguez-Moreno, P.A.; Schwrazbaum, P.J. y Rodríguez, E.M. 1998. Effects of cadmium on gill Na,K-ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae) during postmolt: in vivo and in vitro studies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 629-636.
- Robertson, L.; W. Bray; J. Leung-Trujillo and A. Lawrence. 1987. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *J. World Aqua. Soc.* 18(3): 180-185
- Roesijadi, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aqua. Tox.* 22: 81-114.
- Rosas, C.; A. Sánchez; E. Díaz-Iglesia; R. Brito; E. Martínez and L.A. Soto. 1997. Critical dissolved oxygen level to *Penaeus setiferus* and *Penaeus schmitti* postlarvae (PL₁₀₋₁₈) exposed to salinity changes. *Aquaculture* 152: 259-272.
- Rosas, C.; E. Martínez; G. Gaxiola; R. Brito; A. Sánchez and L.A. Soto. 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234: 41-57.
- Rosas, C.; Cuzon, G.; G. Gaxiola; Y. Le Priol; C. Pascual; J. Rossignol; F. Contreras; A. Sánchez and A. Van Wormhoundt. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259: 1-22.
- Saquid, Muhammad. 1992. *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*. Edit. Marcel DeKker, Inc. N.Y. p.p. 369.
- Satyavathi, Ch. and Y. Prabhakara Rao. 2000. Inhibition de Na⁺/K⁺-ATPase in *Penaeus indicus* postlarve by lead. *Comp. Bio. Physiol. C* 127(2000) 11-22.
- Scheuhammer A.M. and M.G. Cherian. 1986. Quantification of metallothioneins by a Sylver-Saturation Method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82: 417-425.
- Shoshani, Liora and M. Ordaz-Gallo. 2001. La bomba de sodio de las células epiteliales: su relación con la adhesión celular y el cáncer. *Rev. Esp. Cien. Químico-Biológicas* 4(1): 25-35.

- Simkiss, K. 1996. Ecotoxicants at the cell-membrane barrier. In Newman, C. and Jagoe, Ch. 1996 *Ecotoxicology*. A hierarchical treatment. Edit. CRC Press, USA p.p. 61-65.
- Spicer, J.I. and R.E. Weber. 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 C (3): 339-342.
- Tentes, I. and E. Stratakis. 1991. Partial purification and properties of (Na⁺/K⁺)ATPase from *Potamom potamios*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 100C (3): 619-624.
- Thurberg, F.P.; M.A. Dawson and R.S. Collier. 1973. Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. *Mar. Biol.* 23: 171-175.
- Torreblanca, A.; J. Del Ramo; J.A. Arnau y J. Díaz-Mayans 1989. Cadmium, mercury and lead effects on gill tissue of freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Biol. Trace Elem. Res.* 21: 343-347.
- Tucker, R.K. 1979. Effects of in vivo exposure of cadmium on ATPases in gill of the lobster, *Homarus americanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 33-35.
- Tucker, R.K. y A. Matte. 1980. In vitro effects of cadmium and lead on ATPases in the gill of the rock crab, *Cancer irroratus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 847-852.
- Vanegas, P.C.; E. Ríos; R. Cárdenas and C. Robles. 1999. Effect of ammonia on osmoregulation in *Litopenaeus setiferus* juveniles. *J. World Aquac. Soc.* (en prensa).
- Vanegas, Pérez R. C. 1996. *Efectos subletales del cadmio y zinc en el camarón blanco Penaeus setiferus*. Tesis de doctorado en ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM, México. p.p. 118
- Viarengo, A. and J.A. Nott. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrate. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C: 355-372.
- Viarengo, A. M. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution bulletin*, 16: 153-158.
- Villanueva, F. and A. Botello. 1998. Metal pollution in coastal areas of México. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 157 : 53-94.
- Villanueva, F.S. y F. Páez-Osuna. 1996. Niveles de metales en el Golfo de México: agua, sedimentos y organismos. P. 309-347. In: Botello, Alfonso V.; Rojas G.,J.L.; Benítez, J.A. y Zárate, L.D. 1996. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. *EPOMEX, Serie científica 5*. Universidad Autónoma de Campeche. P.p. 666.
- Vitale, A.M.; J.M. Monserrat; P. Castilho and E.M. Rodriguez. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 122C (1): 121-129.

Williams A.B. 1960. The influence of temperature on osmoic regulation in two species of estuarine shrimps (*Penaeus*). *Biol. Bull. Mar. Biol.* 119: 560-571.

Williams, A.B. 1984. *Shrimps, Lobsters and Crabs of the Atlantic Coast of the Eastern United States, Marine to Florida*. Smithsonian Institution Pres. USA. 550 pp.

Wright, D.A. y C.C. Brewer. 1979. Cadmium turnover in the shore crab *carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 50: 151-156.

Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis* 4 Ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey. 942 p p.