

Tesis defendida por
Linda Ramona Lara Jacobo
y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Denisse Re Araujo
Director del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Miembro del Comité

Dra. Rufina Hernández
Coordinador
Programa de Posgrado en Ciencias de
la Vida.

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director
Dirección de Estudios de Posgrado

28 de Febrero del 2013

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas del cangrejo *Cancer antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.

Tesis
que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:
Linda Ramona Lara Jacobo

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Linda Ramona Lara Jacobo, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias, en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas del cangrejo *Cancer antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Denisse Re Araujo

Se evaluaron las respuestas fisiológicas, metabólicas y hematológicas del cangrejo *Cancer antennarius* expuesto a diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 gramos/litro) de sulfato de cobre pentahidratado. Las respuestas que se determinaron fueron, la dosis letal media, la capacidad osmorreguladora, el consumo de oxígeno, excreción de amonio, relación O:N, glucosa, CTH y hemocianina. La dosis letal media calculada fue de 1.6 g/L de sulfato de cobre pentahidratado. El patrón que se siguió la mayoría de las respuestas observadas, es que se incrementaron directamente proporcionales al incremento de la concentración de sulfato de cobre pentahidratado, excepto la capacidad osmorreguladora en la cual se observó un cambio del patrón de regulación de isosmótico a hiposmótico y en la relación O:N se observó una disminución de los valores debido al cambio en el sustrato metabólico como consecuencia del estrés causado por la exposición al sulfato de cobre pentahidratado.

Palabras clave: **Consumo de oxígeno, Excreción de amonio, Sulfato de cobre, *Cancer antennarius*.**

Abstract of the thesis presented by Linda Ramona Lara Jacobo as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Life with orientation in Marine Biotechnology.

Physiological, metabolic and hematological crab *Cancer antennarius* exposed to different concentrations of copper sulfate pentahydrate.

Abstract approved by:

Dra. Ana Denisse Re Araujo

We evaluated the physiological, metabolic and hematological crab *Cancer antennarius* exposed to different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 grams / liter) of copper sulfate pentahydrate. The responses were determined, the median lethal dose, osmoregulatory capacity, oxygen consumption, ammonia excretion, relation O: N, glucose, CTH and keyhole. The calculated median lethal dose was 1.6 g / L of copper sulfate pentahydrate. The pattern is followed most of the observed responses is increased directly proportional to the increase of the concentration of copper sulfate pentahydrate, except osmoregulatory capacity was observed in which a change pattern of regulation and isosmotic to hyposmotic the O: N was observed a decrease in values due to changes in substrate metabolism as a result of stress caused by exposure to copper sulfate pentahydrate.

Keywords: **Oxygen consumption, ammonia excretion, copper sulfate, Cancer Antennarius.**

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

David A. Lara Ochoa y Maria del Rosario C. Jacobo Garcia por todo su cariño y apoyo incondicional en este y en todo los proyectos que he realizado, gracias.

A MI HERMANA:

Ahiko L. Lara Jacobo por ser parte importante de mi vida y por siempre poder contar con su apoyo cuando lo he necesitado eres una parte importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Denisse Re Araujo, por sus consejos, por su orientación y su apoyo durante la realización de esta tesis.

A los miembros de mi comité: Dr. Fernando Díaz Herrera y Dr. Pedro Negrete por sus valiosas observaciones y aportes dados para la realización de este estudio.

Al personal de Biotecnología Marina por darme su apoyo y ayuda para poder Resolver todos los problemas que se fueron presentando durante este trabajo.

A mis compañeros de Generación de Biotecnología Marina, por la buena amistad.

Al personal de Biotecnología Marina por darme su apoyo y ayuda para poder realizar este trabajo de tesis.

Al CICESE, a sus investigadores y personal administrativo por formarme y darme la oportunidad de realizar esta tesis.

AL Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca otorgada durante mi estancia en esta institución.

Contenido

	Página
Resumen español.....	3
Resumen inglés.....	4
Dedicatorias.....	5
Agradecimientos.....	8
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tablas.....	9
I. Introducción	10
II. Hipótesis.....	19
III. Objetivos.....	20
III.1 Objetivo General.....	20
III.2 Objetivos Particulares.....	20
IV. Materiales y Métodos.....	21
V. Resultados.....	29
VI. Discusión.....	38
Conclusiones.....	44
Referencias bibliográficas.....	46

Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución de <i>Cancer antennarius</i> en la zona de recolección del Ejido Erendira, Baja California.	21
2	<i>Cancer antenarrrius</i> dentro del laboratorio húmedo del departamento de Biotecnología Marina, CICESE.	22
3	Extracción de hemolinfa de <i>C. antennarius</i> durante los experimentos.	23
4	Cámaras de policrómato de vinilo para la medición del consumo de oxígeno.	26
5	Reacción de azul de indofenol	26
6	Espectrofotómetro SmartSpec 2000 Marca BioRad	27
7	Contador celular Marca BioRad	28
8	Calculo Probit, ecuación de la recta con porcentajes de sobrevivencia del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuestos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.	30
9	Capacidad osmorreguladora del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuestos a diferentes concentraciones CuSO_4 . La línea de las abscisas representa el punto isosmótico.	31
10	Consumo de oxígeno del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuestos a diferentes concentraciones CuSO_4 . Las barras muestran la	32
11	Excreción de amonio del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuestos a diferentes concentraciones CuSO_4 . Las barras muestran la desviación estándar.	33
12	Relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N) del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuestos a diferentes concentraciones CuSO_4 . Las barras muestran la desviación estándar.	34
13	Nivel de glucosa en la hemolinfa del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones CuSO_4 . Las barras muestran la desviación estándar.	35
14	CTH presentes en la hemolinfa del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones CuSO_4 . Las barras muestran la desviación estándar.	36
15	Concentración de hemocianina en la hemolinfa del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones CuSO_4 . Las barras muestran la desviación estándar.	37

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Resultados de las variables experimentales de <i>Cancer antennarius</i> determinadas para cada concentración.	29
2	Porcentaje de sobrevivencia del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.	30
3	Resultados de la Capacidad osmorreguladora presente en la hemolinfa del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.	31
4	Consumo de oxígeno del cangrejo y excreción de amonio <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.	32
5	Resultados de la Relación O:N del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.	33
6	Nivel de glucosa en la hemolinfa de <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.	34
7	Conteo Total de Hemocitos (CTH) presentes en la hemolinfa del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.	35
8	La concentración de hemocianina presente en la hemolinfa del cangrejo <i>C. antennarius</i> expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.	37

I. Introducción

La teoría evolucionista marca como principal la fisiología, y es por eso que las características funcionales y estructurales parecieran estar diseñadas para incrementar el éxito en un hábitat, las llamadas adaptaciones ambientales (Hochachka P. & Somero G., 1997) estos cambios fisiológicos que experimentan los animales se han venido estudiando desde hace ya varios años, y la principal característica es que el organismo está en una capacidad de autoorganización, la cual es realizada por medio de la homeostasis, donde Claud Bernard (1950) determina a este proceso el control homeostático donde expresa que le confiere una ventaja adaptativa al organismo ya que la influencia externa que el organismo pueda tolerar dependerá de la capacidad amortiguadora de sus mecanismos homeostáticos (Pascual, 2001). En los organismos marinos se cuentan con distintos mecanismos para mantener esta estabilidad fisiológica, la cual se ve afectada directamente con la salinidad, el pH, la temperatura y la presencia de contaminantes.

La homeostasis nos proporciona una característica para la evaluación fisiológica de los organismos. Los organismos son capaces de adaptarse fisiológicamente a su ambiente en el paso de sus estadios de vida (Pascual, 2001).

Una de las capacidades más desarrolladas en los animales marinos es la capacidad osmorreguladora. En crustáceos esta capacidad osmorreguladora es claramente afectada al estar expuestos a metales, ya que regula los solutos sanguíneos para un tiempo determinado a bajas salinidades, debido a que los procesos normales de osmorregulación son esenciales en áreas de salinidad cambiante, cualquier contaminación tanto inducida por la alteración en la regulación osmótica podría razonablemente interpretarse como una restricción de la hábitat normal (Thurberg et al, 1973).

La cuantificación del consumo de oxígeno es esencial en la determinación de gasto energético que requerirá el organismo, es método que evaluara las respuestas a los efectos de los parámetros ambientales tales como salinidad, demanda de oxígeno y contaminación ambiental (Depledge, 1983).

Existe una clasificación para este parámetro del consumo de oxígeno propuesto por Kinne (1967) que menciona cuatro diferentes patrones de consumo de oxígeno ante cambios de salinidad: I) El consumo de oxígeno se mantiene constante, II) El consumo de oxígeno aumenta en salinidades subnormales y disminuye en salinidades supranormales, III) El consumo de oxígeno aumenta en condiciones subnormales y supranormales y IV) el consumo de oxígeno disminuye en salinidades subnormales y supranormales.

Estos involucran el consumo de oxígeno y la expulsión de bióxido de carbono al agua. La expulsión de agua no puede ser medida (particularmente en animales acuáticos) y la medición del CO₂ expelido es difícil debido a que la solubilidad de este gas en el agua es muy alta. Es por esta razón que la actividad respiratoria es más frecuentemente medida como consumo de oxígeno. La cantidad de oxígeno consumido puede ser expresado en unidades de energía utilizando el coeficiente oxicalórico el cual depende de la naturaleza del sustrato metabólico que utilizan los organismos estudiados. Existen diversos equivalentes energéticos publicados en la literatura los cuales han sido calculados tomando en consideración que la cantidad de energía respirada depende de manera directa de la cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos que son metabolizados (Lucas, 1993) y estos pueden ser expresados en tablas comúnmente, pero podría variar entre género de crustáceos, lo que lo hace sumamente valioso este conocimiento (Rosas *et al.*, 2001).

Se han encontrado que existen cambios drásticos en cuanto al consumo de oxígeno debido a contaminantes ambientales, tal es el caso de *Carcinus maenas*, el cangrejo verde o de tierra, y *Cancer irroratus*, el cangrejo de roca, ambos producidos en estuarios de Connecticut, EUA (Thurberg et al, 1973).

La excreción de amonio en los organismos acuáticos se ve disminuida o aumentada dependiendo de las combinaciones de temperatura y salinidad a las que son expuestos los organismos, directamente proporcional al catabolismo de aminoácidos involucrados en esta parte de la regulación osmótica (Bishop *et al.*, 1980) ya que el amonio es utilizado como el ión de intercambio en la regulación del catión Na^+ en el caso de los crustáceos expuestos a bajas salinidades (Mangum *et al.*, 1976). Ya que el amonio es considerado por ser la forma más eficiente energéticamente, para excretar el amonio (Armstrong, 1979). Esta excreción está ligada al metabolismo de la desaminación de ciertos nucleótidos.

La relación atómica Oxígeno-Nitrógeno (O:N) nos permite determinar el tipo de sustrato metabólico que está siendo utilizado por los organismos acuáticos como fuente de energía, al variar los parámetros ambientales, como temperatura, salinidad o exposición a contaminantes (Medina-Zendejas, 2006).

Desde el punto de vista energético un organismo representa un sistema abierto que intercambia energía con su medio ambiente. Esta energía es químicamente enlazada, químicamente convertida, parcialmente utilizada en los procesos metabólicos ó acumulados en algunos tejidos (Vernberg & Piyatiratitivorakul, 1998). A la fecha existen numerosos estudios en los que se ha medido y/o calculado los equivalentes energéticos para carbohidratos, proteínas y lípidos en animales acuáticos (Lucas, 1993). En el intercambio de materia y energía entre los animales acuáticos y su ambiente se llevan a cabo intercambios respiratorios.

El mecanismo de defensa de *C. antennarius* se basa en la actividad de los hemocitos contenidos en la hemolinfa y la liberación de factores séricos como el sistema de la profenoloxidasas. En crustáceos se ha realizado la clasificación de los hemocitos en base a las características morfológicas, ultraestructurales

funcionales y en la presencia o ausencia de gránulos citoplasmáticos. En general son representados en tres grupos: hialinocitos, semigranulocitos y granulocitos.

No se han estudiado detalladamente las respuestas metabólicas como glucosa, lactato, proteínas totales, colesterol, triglicéridos, lípidos y hemocianina o inmunes como conteo total de hemocitos y estallido respiratorio, en este tipo de cangrejo de rocas *C. antennarius* pero se han logrado estudios en otros crustáceos de importancia económica, como el camarón blanco, que en este caso son expuestos a estrés diario debido al manejo de este, y son determinados los parámetros antes mencionados, demostrando así una variabilidad en estos y pudiéndose utilizar como índices del estado nutricional de los crustáceos (Sánchez *et al.*, 2001).

La hemocianina es una proteína encargada de transporte del oxígeno y dióxido de carbono a través de la hemolinfa, constituyendo así el 60 al 95% de las proteínas totales plasmáticas. Se menciona que la hemocianina es una proteína multifuncional, que puede ser utilizada como proteína de reserva, transportador de oxígeno, de carotenoides y como osmolito (Pascual *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista energético un organismo representa un sistema abierto que intercambia energía con su medio ambiente. Esta energía es químicamente enlazada, químicamente convertida, parcialmente utilizada en los procesos metabólicos ó acumulados en algunos tejidos. Así los conceptos de energía y materia pueden ser equivalentes, y las vías para su transformación pueden ser descritas cuantitativamente a nivel molecular, celular, orgánico o comunitario (Vernberg & Piyatiratitivorakul, 1998). A la fecha existen numerosos estudios en los que se ha medido y/o calculado los equivalentes energéticos para carbohidratos, proteínas y lípidos en animales acuáticos (Lucas, 1993). En el intercambio de materia y energía entre los animales acuáticos y su ambiente se llevan a cabo intercambios respiratorios. Estos involucran el consumo de oxígeno y la expulsión de bióxido de carbono al agua. La expulsión de agua no puede ser medida (particularmente en animales acuáticos) y la medición del CO₂ expelido es

difícil debido a que la solubilidad de este gas en el agua es muy alta. Es por esta razón que la actividad respiratoria es más frecuentemente medida como consumo de oxígeno. La cantidad de oxígeno consumido puede ser expresado en unidades de energía utilizando el coeficiente oxicalórico el cual depende de la naturaleza del sustrato metabólico que utilizan los organismos estudiados. Existen diversos equivalentes energéticos publicados en la literatura los cuales han sido calculados tomando en consideración que la cantidad de energía respirada depende de manera directa de la cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos que son metabolizados (Lucas, 1993) y estos pueden ser expresados en tablas comúnmente, pero podría variar entre género de crustáceos, lo que lo hace sumamente valioso este conocimiento (Rosas *et al.*, 2001).

Otro de los factores que han impulsado cambios fisiológicos en los organismos marinos han sido los contaminantes, ya que en los últimos años han ido en incremento, las zonas textiles, la minería, la explotación de mantos acuíferos, son las principales causas de este incremento de contaminantes en el mar. Uno de los principales contaminantes son los metales ya que producen un factor que puede modificar diversas respuestas funcionales en los crustáceos, como el cambio repentino en las mudas en el ciclo del cangrejo azul (Engel, 1993), el crecimiento y la sobrevivencia (Amin & Comoglio, 2010), así como la presión osmótica de la hemolinfa que permite conocer la capacidad osmorreguladora de esta especie de cangrejo *C. antennarius* (Jones, 1950) debido a esto se desencadenan respuestas de adaptación a través de diferentes mecanismos de regulación, este proceso se realiza en la hemolinfa y el intercambio de iones se obtiene a través del tejido branquial y el tracto digestivo principalmente (Chen & Lin, 1992).

El cobre es un micronutriente esencial para la biota y para el ser humano, así como también es uno de los principales metales que existen en mayor proporción disueltos en el agua de mar, estos se pueden dividir en dos categorías

principales, los elementos más importantes y los elementos traza, aunque esto no tiene incidencia en cuanto a su función o importancia. Entre los principales elementos (ordenados según su concentración en el agua de mar, comenzando por la más alta concentración) se encuentran el cloro, sodio, magnesio, azufre, calcio, potasio, bromo, estroncio, boro y flúor. Estos representan alrededor del 99,99% de todos los compuestos disueltos en agua de mar (Spotte 1979; Glaser 2008). Así, sólo el 10% de todos los elementos conocidos son componentes importantes del contenido de la composición del agua de mar, y por lo tanto de la densidad. Todos los demás elementos se clasifican como elementos traza. Estos se subdividen en los iones de menor concentración en el agua de mar en elementos traza y ultra traza. Este sistema clasifica como oligoelementos todos los elementos en el agua del mar con una concentración de entre 1 μM y 1 nM. Por el contrario, los elementos ultra traza se encuentran en una concentración de menos de un nanómetro. Sobre la base de esta definición los elementos traza incluyen bario, vanadio, cromo, molibdeno, hierro, cobre, níquel, aluminio, y el yodo, mientras que los ultra oligoelementos son el manganeso, cobalto, plata, oro, mercurio y uranio (Thompson *et al.*, 2004; Chavez-Sanchez *et al.*, 2008).

Las concentraciones marinas de cobre varían de entre 0.05 microgramos por L hasta 810-1000 microgramos por L (Soegianto *et al.*, 1999). A pesar de la importancia que implica a nivel hematológico para los crustáceos, el cobre puede provocar alteraciones metabólicas elementales para la sobre vivencia de estos (Atul *et al.*, 2011), incluyendo esos que están relacionados con el metabolismo y estrés oxidativo (Thurberg *et al.*, 1973).

Estudios recientes han demostrado que algunos metales como el cobre poseen la capacidad de producir especies reactivas al oxígeno, lo cual resulta en una peroxidación lipídica, un grave daño al ADN, cambios en los grupos sulfhídros de algunas proteínas y una alteración a la homeostasis del calcio (Stohs and Bagchi, 1995; Barata *et al.*, 2005). Esta sensibilidad al cobre puede estar relacionada directamente con la homeostasis del calcio, y ya que este puede ser absorbido

fácilmente por su tamaño a través de la membrana celular, lo lleva a ser un problema grave de contaminación.

Las concentraciones de metales han sido monitoreadas desde los años 80's donde se comienza a observar un aumento de ciertos metales en el mar, en los últimos años se han llevado a cabo comparaciones de estas mediciones y se ha observado que los principales metales que van en aumento son cobre, cadmio y zinc (Guitierrez-Galindo *et al.*, 1997). La importancia de observar el cobre en los organismos marinos y sobre todo en los crustáceos que podrían tener una mayor tolerancia ya que aparte de ser un micro nutriente para la realización de sus procesos fisiológicos, ya que estos animales tiene en su química sanguínea este metal como pigmento respiratorio, lo cual hace pensar que poseerá una tolerancia mayor a este metal (Johansson *et al.*, 2000)

Actualmente se ha considerado al cobre como un contaminante altamente peligroso, puesto que su origen antropogénico ha aumentado considerablemente. Para la biota en general es un micronutriente, es decir necesario en cantidades a nivel traza como cualquier oligoelemento, pero toxico a concentraciones mayores (Graham *et al.*, 1982). Se puede acumular con mayor concentración en el medio marino en donde confluyen la escorrentías de la utilización del cobre a nivel industrial (SEMARNAT, 2002). Para este estudio será necesario primero considerar al cobre primero como indispensable para los organismos, para luego tener en consideración los riesgos medio ambientales de la presencia de este en demasía.

Cancer antennarius es un cangrejo importante a nivel comercial en Baja California tanto en el norte como el sur, su distribución se extiende hasta el norte de California hasta llegar a Alaska (Mac Ginitie, 1935). Vive en costas rocosas, semi enterrada en sustratos arenosos bajo piedras, preferentemente en bahías y estuarios. Las hembras ovígeras se encuentran en invierno sin embargo en los meses de se observaron en el laboratorio desde junio a septiembre (Mac Ginitie, 1935; Garth & Abbott 1980, Carroll 1982, Reilly 1987) y su fecundidad es alta; Mac

Ginitie (1968) dan una cifra de de 2 a 5 millones de huevos para una hembra de 148 mm de ancho de caparazón. La madurez sexual se alcanza a los dos años de edad y a una talla de 60 a 80 mm de ancho (Carroll 1982; Re & Bückle, 1983)

Debido a la importancia comercial de *C. antennarius* en Baja California, se ha pensado en la posibilidad de una biomagnificación dada por la contaminación de metales pesados provenientes de las actividades antropogénicas y por las repercusiones que podría traer consigo a la población en general, entender el comportamiento y sus cambios fisiológicos en este cangrejo, nos ayudaría a identificarlo y eliminar este posible efecto (Guthrie *et al.*, 1979).

El cangrejo de las rocas *Cancer antennarius* es encontrado en las rocas de la costa del Pacífico de Norte América, entre San Francisco, California y Baja California, México. La presencia de este cangrejo es mas abundante en México (Carroll, 1989). En su descripción física, se menciona como un cangrejo que en los adultos pueden tener una anchura de caparazón de hasta 155 mm, aunque las hembras nunca superen una anchura de 145 mm. El caparazón es más ancho en la octava de los nueve dientes antero-laterales. La coloración dorsal es generalmente un color rojo oscuro o marrón, aunque esto puede variar a tonos de naranja o gris. La cara ventral es de color blanco, con manchas rojas características. Las poderosas tenazas son de color negro en la punta, y las patas o pereiópodos con la presencia de setas. El último rasgo es más común en las hembras Las antenas de *C. antennarius* se encuentran entre los pedúnculos oculares, y son claramente largas comparadas con otros de este género. Como con todos los miembros del género *Cancer spp.*, los machos tienen un abdomen puntiagudo más delgado que las hembras (Carroll, 1989;. Mohler *et al*, 1997). El apareamiento ocurre con mayor frecuencia en primavera y otoño. El proceso se lleva a cabo después de que se presenta la muda en la hembra, y mientras que su caparazón está en un estado blando. El apareamiento se estimula por la liberación de una feromona. Los machos se aparean tomando con las tenazas a las hembras , y permanecen en esa posición hasta que el caparazón de la hembra se ha endurecido. Durante el cortejo, un espermátforo se coloca dentro de la

hembra, el esperma de esta forma se puede utilizar para desoves múltiples. El espermátforo se endurece en el tracto reproductivo de la hembra, lo que impide que otros machos fertilicen los huevos de la hembra. Los huevos son expulsados once semanas después del apareamiento, y se fecundan internamente como la hembra los libere. Después de un período de 7-8 semanas, eclosionan las larvas a partir de una masa color naranja donde se encuentran los huevos. El progreso de las larvas es a través de seis etapas de crecimiento, y son planctónicas mientras continúan con este. Las corrientes oceánicas causan que las larvas se han ampliamente distribuidas en la plataforma continental. Hasta la última etapa del crecimiento larval es cuando se mueven cerca de la costa (Carroll, 1989).

Pocos estudios se han realizado sobre el comportamiento de *C. antennarius*. Los pocos estudios demuestran que este animal rara vez viaja más que unos pocos kilómetros del lugar en el que se desarrollo la última etapa de crecimiento larval. Estos estudios sugieren que exhibe cierto grado de movimiento en tierra-mar, aunque este fenómeno no ha sido completamente examinado. Los movimientos en cuestión se piensa que están regulados por ciclo de muda de los animales. El proceso de muda está regulado por las hormonas esteroides llamadas ecdisteroides. Estas hormonas son secretadas por las glándulas conocida como órganos Y. Los adultos pequeños mudan cada 5 a 8 meses, mientras que los individuos más grandes mudan cada 12 a 18 meses (Carroll, 1989; Spaziani, 1989).

C. antennarius se alimenta por medio detritus o carroña y la depredación. La dieta del animal consiste en una variedad de bivalvos, equinodermos y moluscos, así como otros crustáceos como los cangrejos ermitaños. Carroll (1989) ha mantenido un número de estos animales, y realizado dietas a base de camarones y calamares. Esta mezcla parece ser muy adecuada para el animal en un acuario. *C. antennarius* es muy sensible al olor de la comida en el agua, y esta capacidad sirve como un medio importante de localizar el alimento.

Los animales que se aprovechan de los adultos *C. antennarius* incluyen nutrias marinas, tiburones, pulpos y lubina grande. El animal es más vulnerable a los

ataques después de que mudan. En este momento, la cáscara es suave, y el animal tiene poca protección contra los depredadores. Los miembros juveniles de esta especie son presa de una gran variedad de peces bentónicos, incluyendo, pero no limitado a, cabracho, cabezón, bajo la arena y peces roca. El gusano poliqueto *Iphitime holobranchiata* se sabe que infesta las branquias de este cangrejo de roca en particular, y la infestación es a veces letal (Carroll, 1989).

La importancia comercial de este cangrejo radica en su sabor que se informa, similar a la del cangrejo *Dungeness sp.*, *C. antennarius* se pesca tanto comercial como recreativamente. La industria es menor, en comparación con la pesquería de *Cancer magister* o el cangrejo Dungeness. La mayoría de la pesca de *C. antennarius* se centra en California (Carroll, 1989).

II. Hipótesis

Al exponer al cangrejo *Cancer antennarius* a la inyección de sulfato de cobre pentahidratado se esperan cambios fisiológicos, metabólicos y hematológicos, así como una relación entre ellos.

III. Objetivos

III.1 Objetivo general:

Evaluar los cambios fisiológicos, metabólicos y hematológicos de *Cancer antennarius* así como la determinación de la DL50 ante la inyección de sulfato de cobre a diferentes concentraciones.

III.2 Objetivos particulares:

-Evaluar los cambios metabólicos en *Cancer antennarius* en presencia de sulfato de cobre a diferentes concentraciones (0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L) y los controles (basal y salino) estos cambios se observaran en el consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y en la relación O:N.

-Evaluar los cambios fisiológicos en *Cancer antennarius* en presencia de sulfato de cobre a diferentes concentraciones (0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L) y los controles (basal y salino) estos cambios se observaran en la capacidad osmorreguladora.

-Evaluar los cambios hematológicos en *Cancer antennarius* en presencia de sulfato de cobre a diferentes concentraciones (0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L) y los controles (basal y salino) estos cambios se observaran en conteo total de hemocitos y hemocianina.

-La determinación de la Dosis letal media de sulfato de cobre pentahidratado en *Cancer antennarius*.

IV. Materiales y Métodos

IV.1 Obtención y mantenimiento de los organismos

El cangrejo *Cancer antennarius* fue obtenido del Ejido Eréndira, Municipio de Ensenada, Baja California México (latitud 31°16'19.52"N, longitud 116°23'46.46"W) dentro del rango de peso de 200-300 gramos de peso húmedo (Figura 1).



Figura 1. Distribución de *Cancer antennarius* en la zona de recolección Ejido Eréndira, Baja California.

IV.2 Aclimatación del cangrejo *Cancer antennarius*.

Se dejaron en aclimatación una semana a temperatura ambiente, con agua de recambio del sistema cerrado del CICESE, y se alimentaron diariamente con pescado fresco. Fueron distribuidos de manera individualizada en canastas en grupos de 20 cangrejos. En total se utilizaron, 250 cangrejos adultos, que fueron seleccionados al azar antes de cada experimento (Figura 2).



Figura 2. *Cancer antennarius* dentro del laboratorio húmedo del departamento de Biotecnología Marina, CICESE.

IV.3 Controles experimentales

Se utilizaron 50 cangrejos como controles experimentales, de los cuales 25 fueron inyectados con solución salina 500 μL , a este grupo se le llamo “control salino”. Otro grupo de 25 se etiqueto como “control” al cual no se le inyecto nada. A todos los grupos se les realizaron los mismos análisis que a los de los experimentales.

IV.4 Inyección del sulfato de cobre pentahidratado.

Se prepararon diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado diluido en agua de mar. En cada experimento el número de individuos fue de 25 cangrejos por concentración (0.5 g/L, 1.0 g/L, 1.5 g/L, 2.0 g/L) mas los controles experimentales uno inyectado con solución salina estéril y el otro sin inyección como se describió anteriormente. A todos los grupos se les inyectaron 500 μL de la solución en el pereiópodos del lado derecho.

IV.5 Supervivencia y Dosis letal media

Se revisó la bibliografía existente sobre las concentraciones inyectadas de sulfato de cobre pentahidratado y se realizó un experimento previo para ver los parámetros de la concentración, realizando un cálculo final, así se llegó a las concentraciones experimentales (0.5 g/L, 1 g/L, 1.5g/L, 2.0g/L y 2.5g/L). Se calculó la dosis letal media (DL50) a 24 hrs al utilizar estas concentraciones y observar la supervivencia.

IV.6 Extracción de hemolinfa:

Se extrajo la hemolinfa de 6 cangrejos para cada condición experimental (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/L) incluyendo controles, esto se llevó a cabo por medio de una jeringa hipodérmica de 1mL con una solución anticoagulante de heparina, esta fue insertada en la coxa del cangrejo, de los cuales se extrajeron aproximadamente 300 μ L de hemolinfa, con una pipeta automática una vez obtenida la hemolinfa se colocó en una hoja de parafilm el cual se mantenía frío en una plancha. Se dividió la hemolinfa para su análisis en fracciones de 50 μ L la cual fue diluida (1:1) con la solución de Vargas-Albores et al., 1993 para el análisis de conteo total de hemocitos, 50 μ L diluidos en 100 μ L de Alsever para el análisis de cuantificación de glucosa (Figura 3).



Figura 3. Extracción de hemolinfa de *C. antennarius* durante los experimentos.

IV.7 Determinación de la capacidad osmorreguladora.

Para la medición de la osmolaridad de la hemolinfa, se tomaron 15 μ L de hemolinfa. La osmolaridad de la hemolinfa y del agua fueron determinadas por el osmomómetro marca HACH, y los datos expresados en mmol kg⁻¹. Para evaluar la capacidad osmorreguladora de los organismos provenientes de cada tratamiento, esta se calculó a partir de la siguiente fórmula: CO = concentración del medio interno – concentración del medio externo (Charmantier *et al.*, 1989).

IV.8 Consumo de oxígeno y excreción de amonio.

Se cuantificó el consumo de oxígeno de los organismos utilizando un respirómetro semiabierto, la concentración de oxígeno fue medida mediante un oxímetro (YSI52B), con un sensor polarográfico evitando que se tuviera contacto con el aire. Se tomó también una muestra inicial de oxígeno antes de cerrar las cámaras respirométricas. Se colocaron de forma individual 13 cangrejos dentro de 13 recipientes de aproximadamente 3000 mL y se dejó una cámara respirométrica sin organismo, para medir el consumo de oxígeno de los microorganismos presentes en el agua (control). La temperatura del agua fue mantenida a 26 \pm 1 °C.

Las cámaras respirométricas permanecieron cerradas durante 40 minutos, cálculo obtenido de la bibliografía, según Thurberg, *et al.* 1973. Las cámaras utilizadas constaron de un recipiente completamente hermético, el cual poseía una válvula en donde se permite la entrada de agua aireada y la salida de agua con baja concentración de oxígeno, además cuenta con una entrada para permitir inflar un globo que desplaza el agua interior del recipiente, de esta manera el agua puede salir por la válvula para permitir la lectura de la concentración de oxígeno. En cada concentración se midió el consumo de oxígeno y el porcentaje de saturación inicial. Al finalizar las lecturas iniciales de oxígeno disuelto se iban cerrando en cada cámara el flujo de agua durante 40 minutos según el cálculo realizado. Una vez finalizado este tiempo se realizaba la medición final y se reabría el flujo de agua aireada para permitir el recambio de agua en las cámaras (Figura 4).

Se realizó el cálculo de (TCO) de los organismos expuestos a las diferentes concentraciones. Y TCO se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$TCO = (C_t - C_o) V / (W \times T)$$

donde $C_t - C_o$; es el cambio en el contenido de oxígeno ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), V es el volumen de la botella control antes y después de las pruebas, W fue el peso de *C. antennarius* (g) y T el tiempo de duración (h), respectivamente.

Para la realización de las mediciones de excreción de amonio y poder determinar la tasa de excreción de amonio (TEA) se siguió el procedimiento descrito para el consumo de oxígeno. En este caso se recolectaban 10 mL de agua de cada cámara para medir la concentración de amonio utilizando el método de azul de indo fenol de Rodier (2000). Las muestras de agua se colocaron en tubos de ensayo lavados con ácido clorhídrico al 5% y enjuagados con agua destilada y etiquetados. Posteriormente se le agregaban los reactivos necesarios para inducir la reacción azulada la cual se observó que era directamente proporcional a la cantidad de amonio presente en la muestra.

La reacción de azul de indo fenol se llevó a cabo mezclando 10 mL de agua de muestra, 0.4 mL de solución alcohólica de fenol, 0.4 mL de solución de nitro prusiato sódico y 1 mL de solución oxidante (Figura 5). Los tubos se cubrían con PARAFILM y se dejaban incubar por una hora. Una vez concluida la reacción las muestras eran leídas en un espectrofotómetro de absorbancia (DR/4000U Spectrophotometer). La concentración de amonio se determinaba mediante una curva de calibración, con cloruro de amonio como indicador. El cálculo para la TEA se llevó a cabo con la siguiente ecuación:

$$TEA = (C_t' - C_o') V / (W \times T)$$

donde $C_t' - C_o'$ es el cambio en la excreción de amonio inicial y final ($\text{mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), V es el volumen de la botella control antes y después de las pruebas, W fue el peso de *C. antennarius* (g) y el T el tiempo de duración (h), respectivamente.



Figura 4. Cámaras de policrómato de vinilo para la medición del consumo de oxígeno.

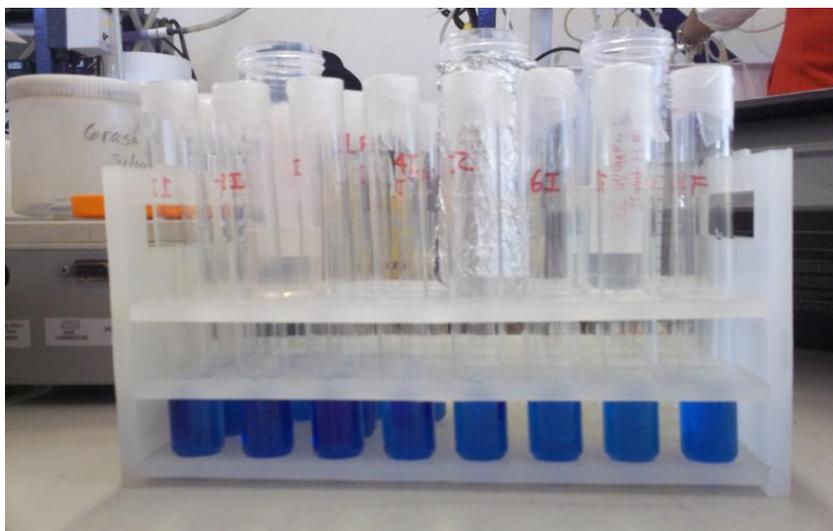


Figura 5. Reacción de azul de indofenol

IV.9 Relación atómica O:N

La relación atómica oxígeno: nitrógeno (O:N) fue calculada utilizando los valores obtenidos del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los cangrejos expuestos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$O:N = \text{peso atómico } (NH_4^+) / \text{peso atómico } (O_2) * [QO_2] / [NH_4^+]$$

donde $[QO_2]$, es el consumo de oxígeno, y $[NH_4^+]$ es el amonio total excretado por los organismos.

IV.10 Cuantificación de Glucosa

Las muestras se centrifugaron a 800 g por 3 minutos, a 4^o C y el sobrenadante, fue separado para la cuantificación de glucosa, se realizó por medio del kit llamado "Pointe scientific, Inc." con una sensibilidad de 1 mg/dl. Estas muestras fueron leídas a 500 nm, en un espectrofotómetro marca Hach, la concentración de glucosa fue calculada con sus respectivos estándares (Figura 6).



Figura 6. Espectrofotómetro SmartSpec 2000 Marca BioRad

IV.11 conteo total de hemocitos (CTH)

El conteo total de hemocitos se llevo a cabo con un contador automatizado de células llamado CT10 por medio de laminillas donde se introdujo la hemolinfa con el anticoagulante Vargas y Albores et al, 1993 y se coloco dentro al contador para su apropiada lectura (Figura 7).



Figura 7. Contador celular Marca BioRad

IV.2 Hemocianina

La cuantificación de hemocianina se obtuvo inmediatamente después de la extracción, se tomaron muestras de 10 μ L de hemolinfa sin heparina, de los organismos provenientes de todos los experimentos, las muestras fueron diluidas con 990 μ L de agua destilada en las celdas del espectrofotómetro y se leyeron a 280 nm (Engel & Brouwer, 1987). La concentración de Hc se determinó según el cálculo en base a una subunidad de 74000 Da para crustáceos (Hagerman, 1986).

V. Resultados

Se determinó en *Cancer antennarius* la DL50, posteriormente las variables fisiológicas (capacidad osmorreguladora, consumo de oxígeno, excreción de amonio e índice O:N), las metabólicas (glucosa) y hematológicas (CTH y hemocianina). (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de las variables experimentales de *Cancer antennarius* determinadas para cada concentración.

	Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
% Supervivencia	100.00%	95.00%	95.00%	66.66%	58.30%	41.66%
Capacidad Osmorreguladora	-1	-3	-3	-29	-57	-64
Consumo de Oxígeno	46.06	47.87	49.79	65.36	74.58	84.99
Excreción de Amonio	0.26	0.28	0.31	1.2	1.24	1.43
O:N	54.56	46.75	35.45	26.25	15.5	11.25
Glucosa	25.72	27.45	31.24	44.59	60.41	74.63
CTH	3	4.87	5.68	6.98	8.28	9.36
Hemocianina	2.5	2.53	2.7	3.87	4.56	5.34

V.1 Supervivencia y dosis letal media

En el grupo control se observó una supervivencia del 100% mientras que en el control salino y aquellos inyectados con la concentración de 0.5 g/L tuvieron una supervivencia del 95%, la supervivencia de los organismos en la concentración de 1.0 g/L fue del 66.66%, mientras que en los expuestos a 1.5 g/L la supervivencia disminuyó al 58.30% y en la concentración de 2.0 g/L la supervivencia de los cangrejos disminuyó a 41.66% (Tabla 2 y Figura 8).

La dosis letal media fue determinada por el método Probit, se obtuvo que la DL50 fue de 1.6 g/L.

Tabla 2. Porcentaje de sobrevivencia del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.

Porcentaje de sobrevivencia	
Control	100.00%
Control Salino	95.00%
0.5 g	95.00%
1.0 g	66.66%
1.5 g	58.30%
2.0 g	41.66%

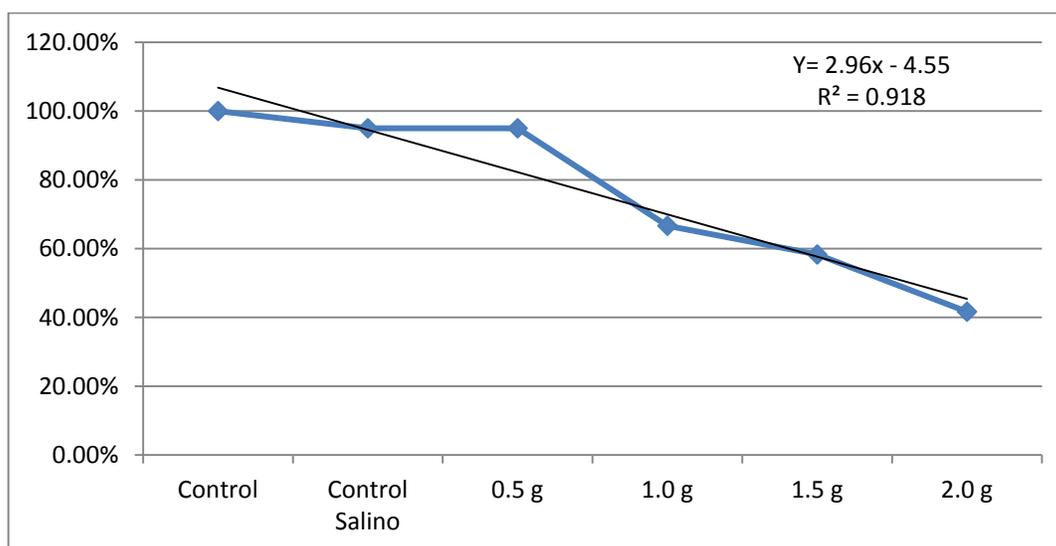


Figura 8. Cálculo Probit, ecuación de la recta con porcentajes de sobrevivencia del cangrejo *C. antennarius* expuestos a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.

V.2 Capacidad osmorreguladora.

En los organismos experimentales, expuestos al sulfato de cobre pentahidratado mostraron un efecto adverso en relación a su capacidad osmorreguladora. Cambio de isosmótico a hiposmótico conforme a la dosis de cobre se incremento en la hemolinfa de *C. antennarius* (Tabla 3 y Figura 9).

Tabla 3. Resultados de la Capacidad osmorreguladora presente en la hemolinfa del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.

Capacidad Osmorreguladora					
Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
-1 \pm 3.08 ^A	-3 \pm 3.93 ^A	-3 \pm 3.58 ^A	-29 \pm 4.10 ^B	-57 \pm 5.32 ^C	-64 \pm 4.11 ^C

*Las letras diferentes representan que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

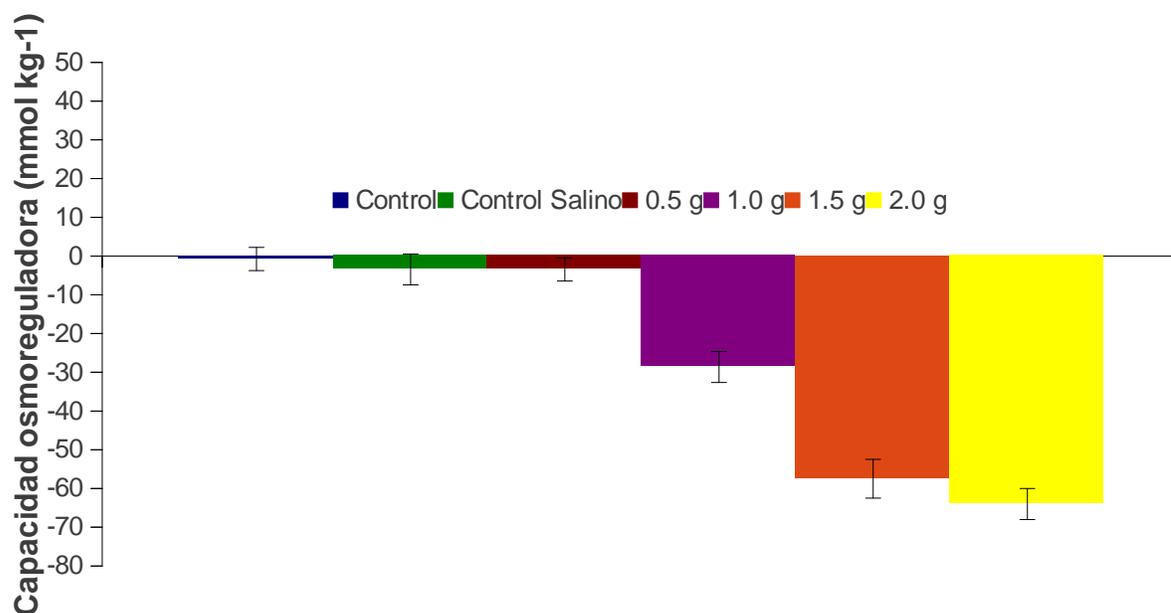


Figura 9. Capacidad osmorreguladora del cangrejo *C. antennarius* expuestos a diferentes concentraciones de CuSO_4 . La línea de las abscisas representa el punto isosmótico.

V.3 Consumo de oxígeno y excreción nitrogenada

El consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de *C. antennarius* se incremento conforme se incremento la dosis de cobre (Tabla 4). Los intervalos de valores para la TCO fueron de 46.06 a 84.00 $\text{mgO}_2\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$, para la TEA de 0.26 a 1.43 $\text{mgNH}_4^+\text{h}^{-1}\text{kg}^{-1}$. Siendo significativamente diferentes ($p < 0.05$) (Figura 10 y 11).

Tabla 4. Consumo de oxígeno del cangrejo y excreción de amonio *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.

Consumo de oxígeno					
Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
46.06 \pm 9.08 ^A	47.87 \pm 9.93 ^A	49.79 \pm 10.58 ^A	65.36 \pm 10.10 ^B	74.58 \pm 10.32 ^C	84.00 \pm 10.11 ^C
Excreción de amonio					
Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
0.26 \pm 0.28 ^A	0.28 \pm 0.19 ^A	0.31 \pm 0.22 ^A	1.20 \pm 0.20 ^B	1.24 \pm 0.22 ^C	1.43 \pm 0.21 ^C

*Las letras diferentes representan que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

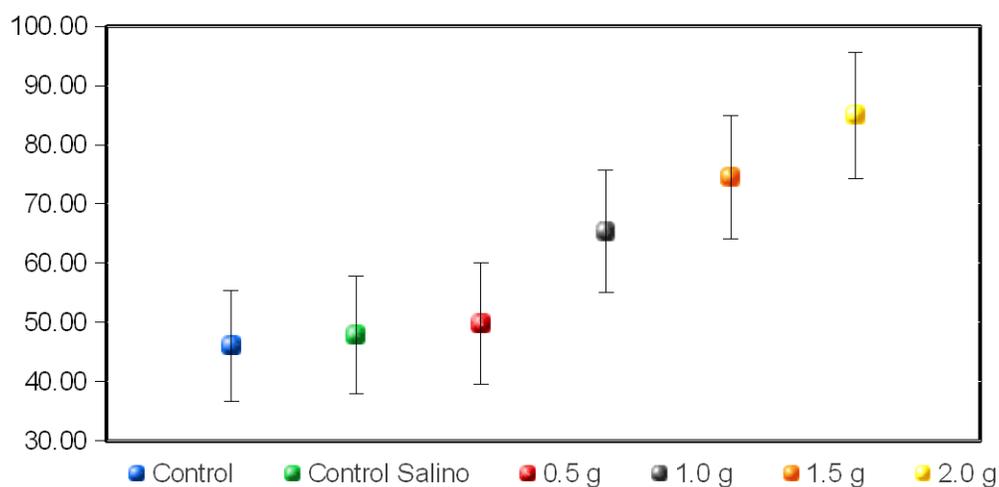


Figura 10. Consumo de oxígeno del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de CuSO_4 . Las barras muestran la desviación estándar.

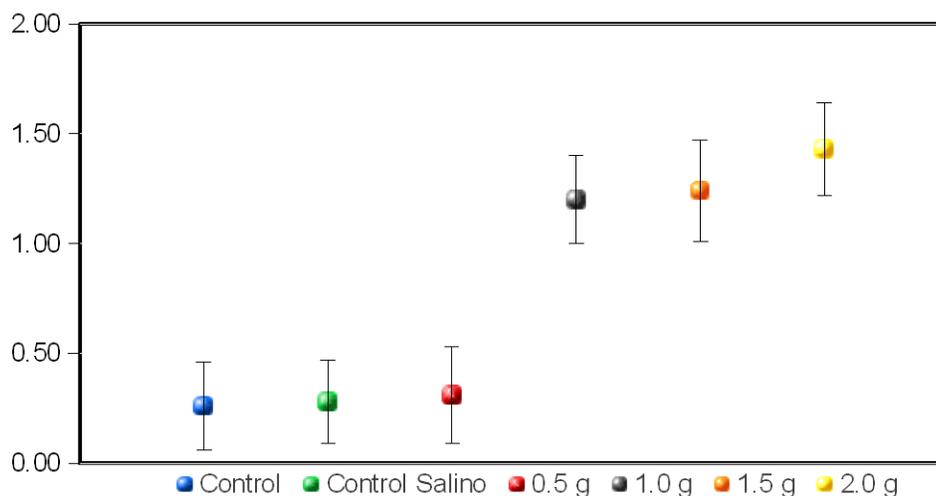


Figura 11. Excreción de amonio del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de CuSO₄. Las barras muestran la desviación estándar.

V.4 Relación atómica O:N

Los resultados de la relación O:N calculada de *C. antennarius* expuestos a las diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado se muestran en la Tabla 7. Se utilizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas entre los valores de la relación O:N en cada una de las diferentes concentraciones; en general se obtuvieron valores de 54.56 a 11.25 que indican un cambio en el tipo de sustrato metabólico utilizado por el cangrejo (Tabla 5 y Figura 12).

Tabla 5. Resultados de la Relación O:N del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.

O:N					
Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
54.56 \pm 4.28 ^A	46.75 \pm 4.61 ^A	35.45 \pm 3.22 ^A	26.25 \pm 4.20 ^B	15.50 \pm 3.22 ^C	11.25 \pm 4.21 ^C

*Las letras diferentes representan que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

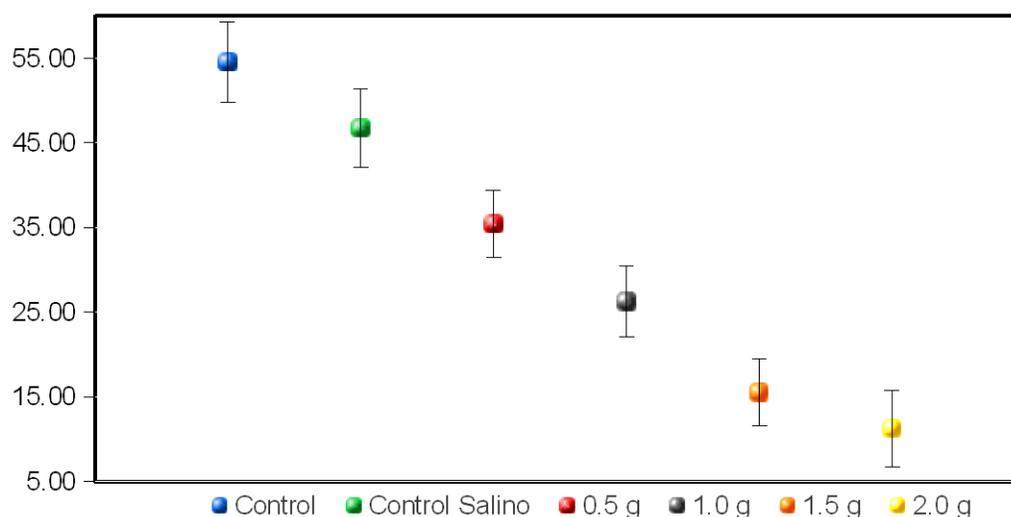


Figura 12. Relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N) del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de CuSO₄. Las barras muestran la desviación estándar.

V.5 Glucosa en la hemolinfa.

Se midió la concentración de glucosa en la hemolinfa de los cangrejos *C. antennarius* que fueron inyectados con sulfato de cobre pentahidratado. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa en la hemolinfa de los organismos control, control salino y expuestos 0.5 g/L de CuSO₄. Sin embargo se encontró un efecto significativo ($p < 0.05$) en relación al incremento de la concentración de cobre en los niveles de glucosa en la hemolinfa de *C. antennarius* (Tabla 6 y Figura 13).

Tabla 6. Nivel de glucosa en la hemolinfa de *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.

Glucosa					
Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
25.72 \pm 4.23 ^A	27.45 \pm 4.61 ^A	31.24 \pm 3.22 ^A	44.59 \pm 4.20 ^B	60.41 \pm 3.22 ^C	74.63 \pm 4.21 ^D

*Las letras diferentes representan que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

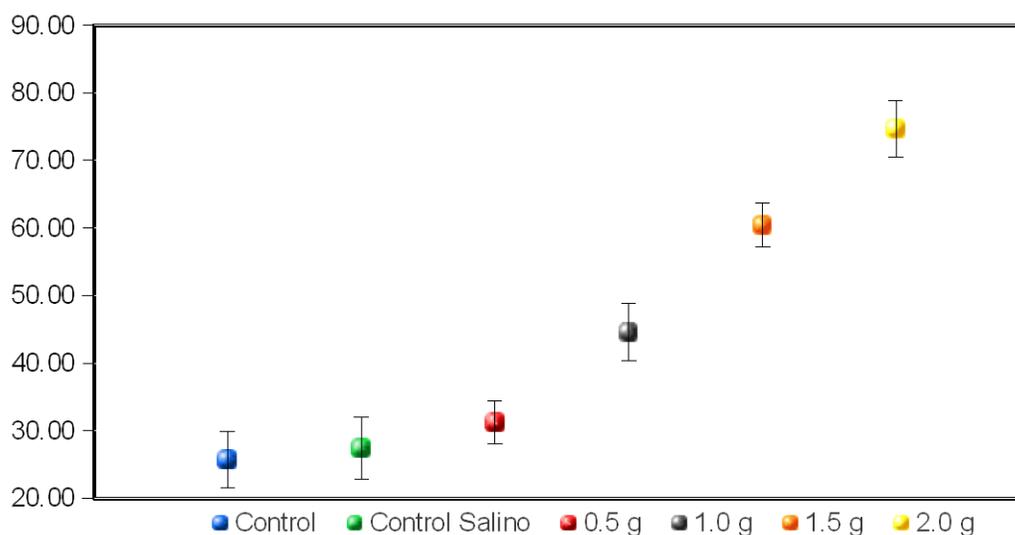


Figura 13. Nivel de glucosa en la hemolinfa de los cangrejos *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de CuSO₄. Las barras muestran la desviación estándar.

V.6 Cuento total de hemocitos (CTH)

No se observaron diferencias significativas en el conteo total de hemocitos entre los organismos del control, control salino y los expuestos a 0.5 g/L de CuSO₄ (Tabla 7). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el CTH de los organismos que fueron inyectados con concentraciones elevadas de CuSO₄ (Figura 14).

Tabla 7. Cuento Total de Hemocitos (CTH) presentes en la hemolinfa del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.

CTH (1 x 10 ⁶)					
Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
3.00 \pm 0.78 ^A	4.87 \pm 0.71 ^A	5.68 \pm 0.62 ^A	6.98 \pm 0.72 ^B	8.28 \pm 0.92 ^C	9.36 \pm 0.51 ^C

*Las letras diferentes representan que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

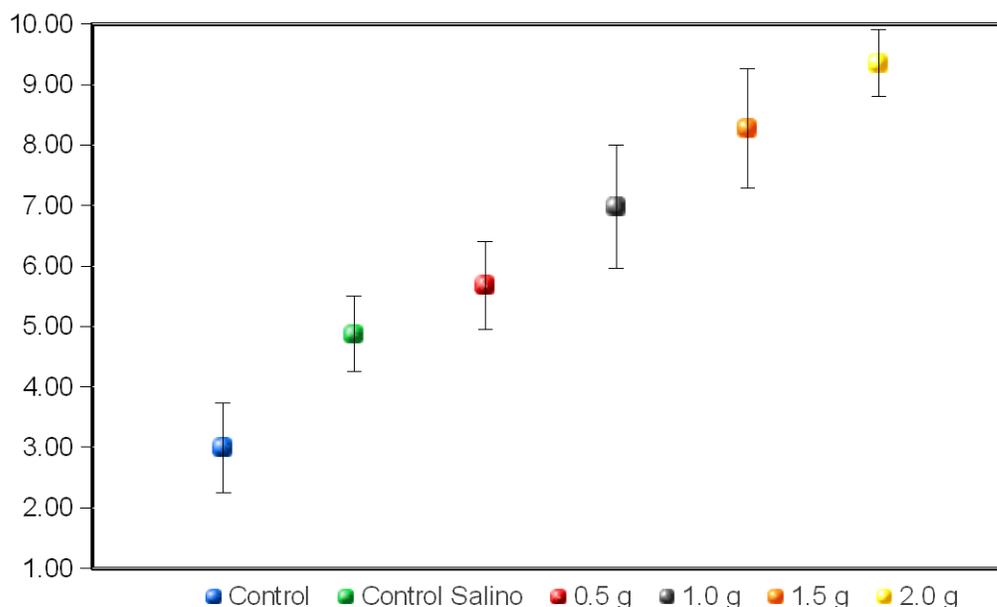


Figura 14. CTH presentes en la hemolinfa del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de CuSO₄. Las barras muestran la desviación estándar.

V.7 Hemocianina

La concentración de hemocianina en la hemolinfa de los organismos expuestos a sulfato de cobre pentahidratado tuvo una variación de 2.50 a 5.34 mmol L⁻¹.

Los organismos de la condición experimental control, no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en sus niveles de hemocianina en un intervalo de 1.53 a 2.83 mmol L⁻¹, con respecto a los organismos del control salino, después de la inyección con la solución salina, manteniéndose en un intervalo de 1.3 a 4.33 mmol L⁻¹.

No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), entre los valores de hemocianina de los organismos del control, control salino, y la concentración de 0.5 g/L de CuSO₄ (Tabla 8). Los organismos inyectados con concentraciones elevadas de sulfato de cobre, mostraron diferencias significativas ($p < 0.005$), en sus niveles de hemocianina (Figura 15).

Tabla 8. La concentración de hemocianina presente en la hemolinfa del cangrejo *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado. Promedio \pm desviación estándar.

Hemocianina					
Control	Control Salino	0.5	1	1.5	2
2.50 \pm 0.58 ^A	2.53 \pm 0.61 ^A	2.70 \pm 0.62 ^A	3.87 \pm 0.70 ^B	4.56 \pm 0.42 ^C	5.34 \pm 0.51 ^C

*Las letras diferentes representan que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

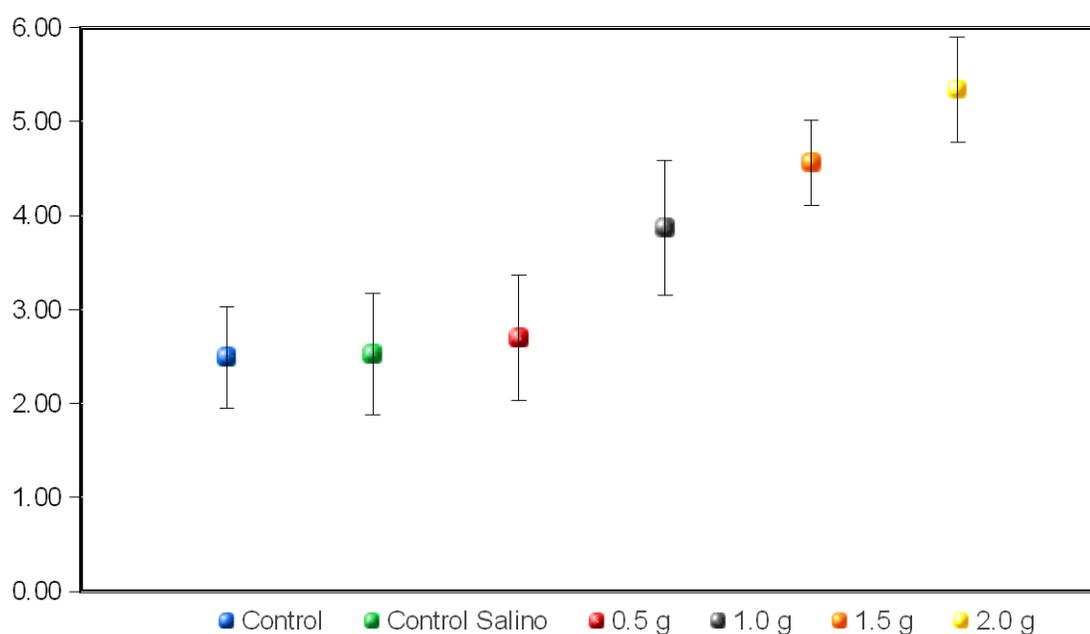


Figura 15. Concentración de hemocianina en la hemolinfa de los cangrejos *C. antennarius* expuesto a diferentes concentraciones de CuSO₄. Las barras muestran la desviación estándar.

VI. Discusión

VI.1 Supervivencia y Dosis letal media.

La supervivencia de *Cancer antennarius* presento diferencias significativas en las diferentes concentraciones del sulfato de cobre pentahidratado inyectado, ya que se observo que la supervivencia disminuyo por debajo del 50% en la concentración de 2.0 g/L. Y la dosis letal media calculada fue de 1.6 g/L de CuSO₄. Mendoza-Rodriguez (2009) en *Cryphiops caementarius* observaron el efecto del sulfato de cobre sobre la supervivencia; en concentración de 0.0078 y 0.0126 g/L, observando una supervivencia del 10 y 0% respectivamente. En el caso del camarón comercial *Artemesia longinaris* se obtuvo una dosis letal media a las 72 hrs de 0.212 g/L (Scelzo, 1997). Para el cangrejo comercial *Lithodes santolla* Amin & Comoglio (2010) obtuvieron que la concentración letal media para cobre fue de 0.002985 g/L a las 96 hrs. En el cangrejo azul *Callinectes sapidus* Verriopoulos *et al* (1987) realizaron estudios de toxicidad aguda al cobre obteniendo que la concentración letal media en la salinidad de 30 ppt fue de 0.530 g/L, a las 96 hrs de exposición.

Estos estudios evidencian que la dosis letal media y la supervivencia de *C. antennarius* comparada con otras especies de crustáceos pueden ser debidas al tipo de exposición de este metal, ya que puede ser directa (inyectado en el sistema circulatorio del crustáceo) o indirectamente (el cobre disuelto en el agua de mar). En la mayoría de los trabajos cuando la exposición fue de forma indirecta las concentraciones que utilizan fueron menores con respecto a las directas utilizadas en *C. antennarius* en este estudio. Esto debido a los estadios de los crustáceos que se utilizan *Cancer antennarius* tuvo una exposición directa al cobre y su concentración letal media estuvo en proporción al volumen de distribución de este cangrejo dando como resultado 1.6 g/L.

VI.2 Capacidad osmorreguladora

De acuerdo a Jones (1978) *Cancer antennarius* tiene un comportamiento osmoconformador (isosmótico) al ser expuesto a diferentes salinidades. Esto es consistente con los resultados observados en *C. antennarius*, donde ocurre un rompimiento en el equilibrio de la capacidad osmorreguladora del cangrejo ante la exposición a las diferentes concentraciones de cobre. Al aumentar la concentración de cobre los organismos mostraban una tendencia hiposmótica al medio externo, observamos un comportamiento contrario en los cangrejos *Carcinus maenas* y *Cancer irroratus* expuestos a diferentes concentraciones de cobre en su medio externo, los resultados de este estudio revelaron una pérdida gradual de la función osmorregulatoria en ambas especies con la exposición a concentraciones crecientes de cobre, también el daño fisiológico branquial es determinante para el atrofio de esta capacidad osmorreguladora.

Por otra parte, existe una alteración en la capacidad osmorregulatoria a bajas salinidades, donde existen mayores demandas osmorreguladoras. Hay opiniones divergentes en la literatura sobre si el consumo de oxígeno aumenta a bajas salinidades por tales demandas osmorreguladoras (Gross, 1957; Krogh, 1965; Sieber et al, 1972). Resultados reportados por Kerkut y Munday (1962) los cuales utilizaron cloruro cúprico comprobaron la teoría de que el consumo de oxígeno aumenta con una mayor demanda osmorreguladora (Thurberg et al., 1973).

VI.3 Consumo de oxígeno y excreción de amonio

El consumo de oxígeno de *Cancer antennarius* se vio afectado por la concentración de sulfato de cobre pentahidratado administrado. Observándose un incremento directamente proporcional a la cantidad de cobre y logrando disminuir un poco este consumo conforme a las horas, logrando recuperarse por completo la concentración de 0.5 g/L de sulfato de cobre pentahidratado y por otro lado al no lograr recuperarse, ocasionando la muerte, como es el caso de la concentración de 2.0 g/L de sulfato de cobre. En otro trabajo realizado por Thurberg et al (1973) *Carcinus maenas* y *Cancer irroratus* muestran una actividad

en el consumo de oxígeno similar al descrito anteriormente, al ser expuestos al cobre incrementan el consumo de oxígeno conforme al incremento en la concentración de cobre. Depledge (1983) observó un cambio en la actividad respiratoria cuando *Carcinus maenas* fue expuesto a cobre (10 mg) el cual ocasionó una supresión cardíaca y un incremento en el consumo de oxígeno. La muerte de estos organismos fue asociada a la pérdida de la capacidad osmorreguladora.

La tasa de excreción de amonio también estuvo directamente relacionada con el proceso de osmorregulación, ya que la excreción de amonio de los cangrejos incrementó conforme a la alteración en la capacidad osmorreguladora. Mostrando que a mayor hipoosmolaridad, mayor excreción nitrogenada. Se han realizado estudios en la excreción de amonio en crustáceos, tal es el caso de *P. Chinensis*, en cual estudio Chen *et al.*, (1994) encontró un incremento en los niveles de excreción de amonio, cuando se realizó un incremento de iones en el medio. Lo anterior debido a que en los medios diluidos los organismos utilizaron para favorecer la captación de sodio, el funcionamiento de las bombas de intercambio de $\text{Na}^+ / \text{NH}_4^+$ para balancear la concentración osmótica de la hemolinfa y con esto ajustar la capacidad osmorreguladora. (Spaargaren *et al.*, 1982; Regnault, 1987 y Jiang *et al.*, 2000).

Los cangrejos control y control salino fueron los organismos que tuvieron los valores del consumo de oxígeno y excreción de amonio similares a los niveles reportados por otros autores que trabajaron con crustáceos, pero comparando distintas salinidades tal es el caso de *L. stylirostris* que incrementa su excreción de amonio al exponerla a las diferentes temperaturas de aclimatación (Re *et al.*, 2004), respuesta que ha sido descrita en otros crustáceos (Spaargaren *et al.*, 1982; Chen y Lai, 1993; Jiang *et al.*, 2000).

Por otra parte, la disminución en la tasa de excreción de amonio durante la exposición al cobre podría ser atribuido ya que a la proteína disminuyó y el

catabolismo de aminoácidos incremento. Esto se observa con mejor detalle en la razón O:N.

VI. 4 Relación O:N

Los cambios en la razón O:N reflejan el tipo de sustrato metabólico oxidado en función de diversos factores como lo son el estadio de desarrollo, el estado fisiológico, el tipo de dieta. Además este índice es útil al estimar la relación metabólica entre los organismos y en el alimento consumido, ya que refleja los diferentes niveles de proteína que contiene el alimento en la relación energía-proteína de la dieta en los organismos (Mayzaud y Conover, 1988).

Por consiguiente, en el presente estudio la disminución de la O:N proporcionada por la mayor concentración de sulfato de cobre pentahidratado está relacionada con la utilización de las reservas proteicas. Como se indica por Cheng *et al.* (2009), es importante tener en cuenta que la relación O:N como un índice de estrés adicional requiere medidas relacionadas con los efectos metabólicos. En trabajos similares con el cangrejo *Lithodes santolla* se observó que ha mayor concentración de cobre (1.61 g/L) se produjo una disminución del 117% en el índice de O:N utilizando como sustrato metabólico a las proteínas (Amin & Comoglio, 2010). Similar a lo obtenido en este estudio, donde se observó que *C. antennarius* en las concentraciones más elevadas de cobre utilizó el mismo sustrato.

Knops *et al.* (2001) describieron tres explicaciones posibles para un cambio metabólico: la primera es que los costos adicionales asociados con el estrés están enmascarados por los efectos del agente tóxico, la segunda es que esta demanda de energía es demasiado pequeña en comparación con otros gastos metabólicos, y el tercero es que al menos durante el período de exposición hay un costo adicional debido al estrés químico.

De acuerdo a lo observado en *C. antennarius* las respuestas en el índice metabólico mostraron cumplir con la tercera explicación de Knops *et al.* (2001) ya que es evidente que el índice al ser tan bajo, tuvo un costo metabólico elevado.

VI.5 Cuantificación de glucosa

En el presente estudio, los organismos de las concentraciones de 1.0 g/L, 1.5 g/L y 2.0 g/L de sulfato de cobre pentahidratado, presentaron un incremento en la concentración de glucosa, debido al estrés causado por el gasto energético derivado a la osmorregulación de manera similar Racotta y Palacios (1998) demostraron que la glucosa en la hemolinfa de *L. vannamei* aumenta como respuesta al estrés producido por muestreos de hemolinfa. Los organismos control, control salino e inyectados con 0.5 g/L de sulfato de cobre pentahidratado la concentración de glucosa fue similar evidenciado, esto que fueron capaces de contrarrestar el estrés de la manipulación y del sulfato de cobre pentahidratado.

VI.6 CTH

En los organismos control y control salino de *C. antennarius* se observó un CTH con un intervalo de 3 a $4.87 \times 10^6 \pm 0.74$ en trabajos realizados con *Carcinus aestuarii* Matozzo & Marin (2009) obtuvieron en los organismos control un CTH con un intervalo de 1.04 a 12.21×10^6 células/mL y con un promedio de 6.4×10^6 células/mL en cual es cercano a lo obtenido en este estudio para los organismos control. Truscott & White (1990) realizaron estudios en *Carcinus maenas* y obtuvieron que los organismos controles tuvieron concentraciones de 14 a 32×10^7 hemocitos por cangrejo, similar a los valores reportados para la misma especie de 25×10^7 (Smith & Ratcliffe, 1978) y 16×10^7 (Smith & Ratcliffe, 1980). Estas concentraciones de CTH son mayores debido a que estos organismos están expuestos a diferentes ritmos de marea. Se observó en *C. antennarius* un

incremento en el conteo total de hemocitos conforme al aumento de la concentración de sulfato de cobre, esto podría deberse a que este mecanismo de defensa en los cangrejos no posee especificidad, por lo cual reacciono a la inyección de sulfato de cobre pentahidratado como si fuera un agente extraño, debido a que no hubo presencia de bacterias en estos organismos los hemocitos, no fueron utilizados contra ningún agente que necesitara ser fagocitado o eliminado por el organismos, por que se acumularon en la hemolinfa conforme se fueron produciendo.

VI.7 Hemocianina

El cobre es un componente necesario de la hemocianina, pero las cantidades excesivas de cobre, se ha visto que son letales para los crustáceos (Raymont y Shields, 1964; Hubshman, 1967; Bryan, 1971). En el presente trabajo se observo como el incremento de sulfato de cobre pentahidratado incremento las cantidades de hemocianina en la hemolinfa de los cangrejos pero si existe una correlación directa entre el consumo de oxígeno y la concentración de hemocianina esto debido a que el oxígeno es transportado por esta proteína y al ser incrementado el consumo de oxígeno requiere una demanda mayor de hemocianina. No se observo ningún cambio significativo en la concentración de 0.5 g/L creyéndose que esta es la concentración óptima del micro nutriente. Existe una correlación directa entre el consumo de oxígeno y la concentración de hemocianina

Conclusiones

- Se encontró que la dosis letal media para *C. antennarius* expuesto a sulfato de cobre pentahidratado fue de 1.6 g/L.
- La sobrevivencia encontrada de *C. antennarius* fue directamente proporcional al incremento de la concentración de CuSO_4 obteniéndose que la concentración de 2.0 g/L fue de 46.6 %.
- La capacidad osmorreguladora se vio afectada al incrementar la concentración de sulfato de cobre pentahidratado, al inducir un desbalance en la presión osmótica de la hemolinfa de típicamente isosmótica a hiposmótica.
- El consumo de oxígeno en el cangrejo *C. antennarius* se vio incrementado en las concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0 g/L de CuSO_4 .
- En la excreción nitrogenada del cangrejo *C. antennarius* se observó un incremento directamente proporcional a la inyección de la concentración de sulfato de cobre pentahidratado.
- Se observó que la relación O:N en los organismos control, control salino y expuestos a 0.5 g/L de sulfato de cobre pentahidratado utilizaron como sustrato metabólico una mezcla de lípidos y carbohidratos. En los organismos inyectados con las concentraciones de 1.0 g/L, 1.5 g/L y 2.0 g/L como sustrato energético utilizado fueron las proteínas debido al estrés producido por altas concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado.
- La cuantificación de glucosa mostró que *C. antennarius* tuvo un incremento de hasta 74.63 en las concentraciones más elevadas de sulfato de cobre pentahidratado al que fue expuesto.
- El conteo total de hemocitos de *Cancer antennarius* mostró una alteración en la concentración de hemocitos en la hemolinfa incrementándose en un 300% en la mayor concentración de cobre.

- La concentración de hemocianina de la hemolinfa en *Cancer antennarius* se incremento en un 100% conforme se incremento la concentración de cobre.

Referencias Bibliográficas

Amin, O; Comoglio, L.I.; Duarte, C; Diodato, S.L.; Botte, S; Spetter, C; Marcovecchio, J. (2010). Evaluación ambiental del desarrollo urbano sobre una ciudad costera: el caso Ushuaia, fin del mundo y puerta de entrada a la Antártida. Congreso Ibérico y V Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental (CICTA).

Armstrong, D. A. (1979). Nitrogen toxicity to crustacea and aspects of its dynamics in culture systems. Proceedings of the Second Biennial Crustacean – Health Workshop. 14 of May 1982, Texas A & M University 329-360 p.

Bishop, J.M., Gosselink, J.G. and Stone, J.H. (1980). Oxygen consumption and hemolymph osmolarity of brown shrimp *Penaeus aztecus*. Fish. Bull., 78: 741–757.

Carroll J. R. Winn. (1989). Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Southwest) brown rock crab, red rock crab, and yellow rock crab. US. Fish and Wildlife Service Biological Report. 82:1-16.

Charmantier, G., Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P., Trilles, J.-P., (1989). Salinity tolerance and osmoregulation capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. Spec. Publ. Aquacult. Soc. 10, 65–66.

Chen, J. C. y C. Y. Lin. (1994). Responses of osmotic and chloride concentrations of *Penaeus chinensis* Osbeck subadults acclimated to different salinity and temperature levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Ser. 110:85-94 p.

Chen, J.C., C.T. Chen. y S.Y. Cheng. (1994). Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. Mar. Ecol. Prog. Ser. 110: 85-94 p.

Chen, J.C. y S.H. Lai. (1993). Effect of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 165: 161-170 p.

Díaz, F., A.D. Re, R.A. González, L.N. Sánchez, G. Leyva y F. Valenzuela. (2007). Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. Aquaculture Research. (13) 38: 1387-1394 p.

Díaz, F., A. D. Re, U. E. Sierra, I E. Díaz. (2005). Effects of temperature and salinity fluctuation on the oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulation of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson). J. of Shellf. Res. 23(3): 903-910p.

Díaz, F., C. Farfán, E. Sierra y A. D. Re. (2001). Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Litopenaeus vannamei*. Boone. Mar. Fresh. Behav. Physiol. 1-12 p.

Díaz, F., S. Espina, c. Rosas, A. Sanches, C. Venegas, E. Dias-Iglesias (1989). Ritmo respiratorio y amplitud metabólica del camarón café *Penaeus aztecus* con ablación de los pedúnculos oculares . Rev. Inv. Mar. 10: 27-39 p.

Díaz F., Farfán C., Sierra E., Re A.D., (2001). Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation in juveniles of *Panaeus vannamei*, Boone. Marine Fish Behavior Physiology. 34:93-104 P.

Díaz-Herrera, F., Pérez-Cruz, E., Luna-Figueroa, J., Tapia-Gamas, A. and Rosas-Vázquez, C. (1992). Oxygen consumption, ammonia excretion and osmoregulation of *Callinectes similis* juveniles (Crustacea: Portunidae) exposed to fluctuating salinities. Cienc. Mar., 18: 93–104.

Engel, D. W. (1993). Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: copper, zinc, and metallothionein. Biol. Bull. 172: 69-82.

Engel, D.W., and M. Brouwer. (1987). Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. Bio. Bull. 173: 237-249.

Guitierrez-Galindo E.A., Villacsusa-Celaya J. A., Flores-Munoz G. (1997). Metales pesados en gracciones geoquímicas de sedimentos de la región fronteriza de Baja California, Mexico y California, EUA. Ciencias Marinas. 23 (1):43-70.

Hagerman, L. (1986). Haemocyanin concentration on *Crangon crangon* after exposure to hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology Parte A 85 (4): 721-724 p.

Hochcachka, P. W. (1991). Design of energy metabolism. En: Prosser, C. L. ed.. Compilation. Animal Physiology. 4ta. Edicion. Wiley-Liss, NewYork, USA. 325-351.

Jiang, D.H., L.A. Lawrence, W.H. Neill y H. Gong. (2000). Effect of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* Juveniles. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 253: 193-209 p.

Kinne, O. (1967). Physiology of estuarine organisms with special reference to salinity and temperature. En Lauff, G.H. (ed.). Estuaries. Washington, D.C.: AAAS Publ. No 53: 525-540 p.

Kutty, M.N., Murugapoopathy, G. and Krishnan, T.S. (1971). Influence of salinity and temperature on oxygen consumption in young juveniles of the Indian prawn *Penaeus indicus*. Mar. Biol., 11: 125–131

Martin, G.G., M. Quintero, M. Quigley y H. Khosrovian. (2000). Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. Journal of Crustacean Biology. (20): 209-217 p.

Medina-Zendejas, R. (2006). Metabolismo respiratorio, excreción nitrogenada, relación O:N, juveniles de *Litopenaeus vannamei* mantenidos a baja salinidad y alimentado con diferentes dosis de astaxantina. Tesis maestría. CICESE. 59 pp.

Pascual, C., G. Gaxiola y C. Rosas. (2003). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. Marine Biology. (142): 735-745 p.

Pascual, C., L. Arena, G. Cuzon, G. Gaxiola, G. Taboada, M. Valenzuela y C. Rosas. (2004). Effect of a size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels. Aquaculture. (230): 405-416 p.

Racotta, I.S. y E. Palacios. (1998). Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. The Journal of the World Aquaculture Society. (29): 351– 356 p.

Re, A. D., F. Díaz, E. Sierra y S. Gómez. (2004). Consumo de oxígeno, excreción de amonio y capacidad osmorreguladora en *Litopenaeus stylirostris* (Simpson) expuesto a diferentes combinaciones de temperatura salinidad. Cien. Mar. 30(3): 443-453p.

Regnault, M. (1987). Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacea. Biol. Rev. 62: 1-24 p.

Rosas, C., G. Cuzon, G. Gaxiola, L. Prior, J. Rossignol, F. Contreras, A. Sanches, y A.V. Wormhoudt. (2001). Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. J. Exp. Biol. Ecol. 259 (1): 22-67 p.

SEMARNAP. (2002). Anuario estadístico de pesca 2002. Secretaria del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México, D. F. 224 p.

Sánchez, A., C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. LeMoullac y C. Rosas. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture. (198): 13 28 p.

Spaargarent, D.H., P. Richard, y H.J. Ceccaldi. (1982). Excretion of nitrogenous products by *Penaeus japonicus* in relation to environmental osmotic conditions. Com. Biochem. Physiol 72A: 673-678 p.

Thompson, F. L., I. Tetsuya y J. Swings. (2004). Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 68(3): 403-431 p.

Vargas-Albores, F. M.A. Guzmán & J.L. Ochoa. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Comparative Biochemistry and Physiology Parte A 106: 299-303.

Vargas-Albores, F., I. Higuera, F. Jiménez, J. Hernández, T. Gollas, y G. Yepiz. (1996). Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 11 al 13 de noviembre de 1996, Nuevo León, Tamaulipas. 433-439 p.

Vargas-Albores, F. (2002). Herramientas para determinar inmunoestimulación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortes, M. G., Simoes, N.. Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo. México