

**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
**Facultad de Ciencias**  
**Escuela de Ciencias Biológicas**

\*

**Estudio Bioquímico e Histoquímico de  
la Succinodeshidrogenasa en Zoeas (De-  
capoda, Brachyura) de la Punta-Callao**

**TESIS PARA BACHILLER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Guadalupe Sánchez Rivas**

\*

**Lima - Perú**  
**1965**

A la memoria de mi MADRE

A mi PADRE

A mis tias Rosa R. de Enriquez y  
Carmela Rivas B. que me han alen  
tado con su cariño.

### AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente al Dr. Alejandro Tapia Freses por sus consejos y orientación del trabajo y con ello a la Cátedra de Química Orgánica.

Asi mismo agradezco al Instituto del Mar del Perú por las facilidades concedidas, a la Sra. Blanca Rojas de Mendiola, Jefe del Programa de Plancton, por su valiosa ayuda.

Y a todas las personas que de alguna forma han contribuido a la finalidad de este trabajo.

SUMARIO

1. Introducción
2. Material y Métodos.
  - 2.1 Material Biológico
  - 2.2 Métodos Bioquímicos
  - 2.3 Métodos Histoquímicos
3. Estadios larvarios de Crustáceos Decapodas
  - 3.1 Larvas del estadio Zoea (Decapoda Brachyura)
4. Breves datos ecológicos
  - 4.1 Flotación
  - 4.2 Locomoción
  - 4.3 Migraciones verticales
  - 4.4 Protección y enemigos
  - 4.5 Alimentación
  - 4.6 Ecdysis y Mortalidad
5. Oxidaciones Biológicas. Las deshidrogenasas
  - 5.1 Succinodeshidrogenasa
  - 5.2 Detectores de la Oxidación Biológica
  - 5.3 El ácido tetracético etilen diamina Edta
6. Resultados de la investigación Bioquímica de la Succinodeshidrogenasa.
7. Resultados de la investigación Histoquímica de la Succinodeshidrogenasa.



8. Resumen y conclusiones.
9. Ilustraciones.
10. Bibliografía.

## INTRODUCCION

El presente trabajo ha tomado a las zoeas, organismos planctónicos para demostrar la importancia que tiene el conocimiento de las enzimas respiratorias en seres marinos, que estan sometidos a diversos factores, entre los cuales citaremos las diferentes profundidades en que se desplazan estos animales, los que nos podría decir si a grandes profundidades el poco oxígeno que existe puede ser lo suficiente como para que las enzimas se presenten positivamente, como en este caso del material biológico superficial.

Es así como se ha aplicado las reacciones para identificar la enzima Succinodeshidrogenasa, típico sistema oxidásico que cataliza la eliminación de hidrógeno, o electrones provocando la oxidación en el sistema sometido a la acción enzimática. El electrón es transportado por el complejo flavínico.

El sistema succinoxidásico, según VERNE y su escuela, pasa por etapas entre las cuales se encuentran los citocromos b y c, los que desempeñan un papel de transportadores electrónicos.

NACHLAS, MARGULIES y SELIGMAN y otros investigadores, sostienen que las sales de tetrazolium no captan directamente los electrones liberados por el sistema

enzimático, sino que son necesarios etapas intermedias y que una de ellas es a través de las diaforasas existentes en los tejidos.

No solo el sistema succinodeshidrogenasa reacciona sobre las sales de tetrazolium, sino también una serie de sistemas deshidrogenásicos son susceptible de reaccionar en la misma forma.

Además, hay que considerar la reducción no enzimática, como la que efectúa el ácido ascórbico, el glutatión y otras sustancias químicas reducciones que tienen lugar a un pH 9.

Por otra parte la identificación de las zoeas no ha sido posible debido a que no existen buenas claves para ello para esta parte de América, información personal recibida del Dr. ANTHONY J, PROVENZANO Jr. de la Universidad de Miami; debido a que no se han realizado estudios de estas larvas con anterioridad, por lo que me he limitado a hacer una descripción, modelo que he tomado de la obra del Dr. D. I. WILLIAMSON. Esta descripción fue revisada por el Dr. H. EINARSSON, entonces Asesor del Programa de Biología del Instituto del Mar del Perú.

Por las razones expuestas, no estoy aun en condiciones de referirme a una identificación estricta, limitando a señalar como pertenecientes, al Grupo Brachyura.

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. MATERIAL BIOLOGICO

Se emplearon larvas del estadio zoea extraídas de la Punta Callao, en muestras zooplanctónicas a cien o doscientos metros de la playa. Se utilizaron redes Standard en arrastre superficial durante 10 a 15 minutos.

Las zoeas así colectadas se trabajaron histoquímicamente y se les hizo la descripción para saber a que grupo pertenecían.

Necesitando grandes cantidades de material biológico para la investigación bioquímica, se extrajerom muestras zooplanctónicas de La Arenilla, La Punta, en este caso la red Standard tuvo un arrastre superficial de 10 a 20 minutos, encontrándose entre mil a dos mil zoeas.

Las muestras en el laboratorio fueron revisadas colocándose en un patris con agua de mar, de donde mediante un gotero las zoeas fueron separadas y colocadas en frascos de 80 cc de volumen con agua de mar.

Con el material vivo se procedió a ejecutar las técnicas respectivas.

### 2.2. METODOS . BIOQUIMICO

Se utilizó para las pruebas bioquímicas homo-

geneizados de las zoeasm las que fueron colocadas vivas en el homogenizador de vidrio.

Las homogenización fue de 4 minutos y con suero fisiológico.

El substrato con el homogenizado se incubó a 37° C durante 60 minutos.

La técnica es la siguiente:

Utilizar Azul de Metileno o 2,6 Dicloro-fenolindolfenol, como aceptor de electrones.

$1 \times 10^{-4}$  en HCl      0.154 M

Azul de Metileno    0.1 mg/ml

Preparar los siguientes reactivos:

Succinato de Sodio    0.1 M

Buffer fosfato pH 7.4 Sol. 0.1 M:

fosfato monosódico 0.2M.....19 ml

fosfato disódico    0.2M.....81 ml

agua destilada.....100 ml

Acido tetracético etilen diamina 0.01M(Edta)

Homogenizado de zoeas.Utilizando Cloruro de

Sodio.....0.154M

Nitro BT 1mg/ml

El substrato es el siguiente:

MUESTRAS	1	2	3	4	5	6
Succinato de Sodio 0.1 M	0.9	0.9	0.9	0.9	-	AGUA DESTILADA
Buffer Fosfato pH 7.4 0.15M	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
Azul de Metileno 10 mg% 6 Sal de TTZ (Nitro BT 1 mg/ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Agua destilada	1.1	1.1	1.1	2.0	2.0	
Homogenizado	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
Edta (0.01M-0.001M- 0.0001M)	0.9	0.9	0.9	-	0.9	
<b>TOTAL</b>	<b>4.9</b>	<b>4.9</b>	<b>4.9</b>	<b>4.9</b>	<b>4.9</b>	

Se adiciona en la prueba del azul de metileno una capa de aceite mineral.

La lectura se efectúa en fotocolorímetro Klett, utilizando filtro azul.

### 2.3. MÉTODOS HISTOQUÍMICOS

Técnica de Seligman y Rutenberg.-

El substrato para la incubación:

Nitro BT (Dajac)	10 mg
Buffer Fosfato pH 7.6 0.1M	5 ml
Succinato de Sodio 0.1M	5 ml
Agua destilada	5 ml

Después de la incubación se fija con formol neutro bufferado y frio. El tiempo para esta fijación es de 30 minutos.

Si se desea contrastar con verde metilo-pironina.

Montaje en glicerina-gelatina.

Modificaciones: El buffer fosfato 0.15 M a un pH 7.4

El Nitro BT empleado fue de las casas Fluka y Sigma. Se fijó en formol 10% bufferado neutro por tiempo ilimitado en refrigeración.

Aplicando la técnica histoquímica descrita a las zoeas enteras, no se procedió a hacer cortes y se incubó en el substrato por espacio de 40 minutos a 37°C. Para facilitar el ingreso del substrato en la región del abdomen y telson, se hizo cortes con ayuda de agujas de las espinas del telson

### 3. ESTADIOS LARVARIOS DE CRUSTACEOS DECAPODAS

Los estadios larvarios de los CDecapodas han sido perfectamente estudiados por GURNEY (1942); siendo este estudio complicado por la gran variedad de nombres con que fueron denominados estos estadios, que muchas veces se les creía adultos conforme se iban descubriendo. Habiendo cientos de nombres de generos no validos que han sido olvidados o descartados.

GURNEY dividió las larvas Decapodas en cuatro categorías: Nauplius, Protozoeas, Zoeas y Postlarval.

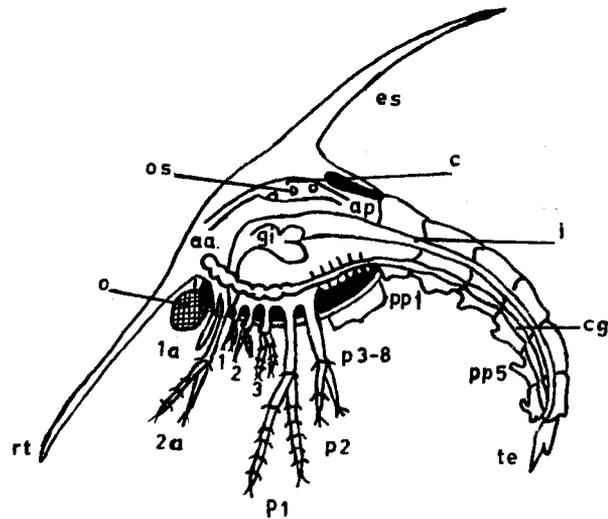
Nauplius: tiene ojos compuestos rudimentarios, boca sellada ya que no se puede alimentar, la caparazón no está desarrollada, no presenta espinas ni procesos en las antenas.

Protozoea: es el estadio donde aparecen dos o tres pares de maxilípedos, la caparazón presente pero no fusionada a la terga torácica.

Zoea: (Lámina N° 1): es el estadio donde sobresalen los apéndices torácicos, la caparazón cubre el cefalotórax. Segun SIEWING posee un corazón musculoso que ocupa casi toda la cavidad de cefalotórax, una glándula del intestino medio que se continua con el intestino terminando en el ano. Poseen branquias primitivas muy rudimentarias en la base de los maxilipedos (GURNEY 1942).

LAMINA N° 1.- Esquemas de la organización interna de la larva zoea (Original Siewing): rt-rostrum, la-antena, 2a-antena, o-ojo, 1-3 parte de la boca: 1-mandibula, 2-maxila, 3-maxila; pl-p8 extr. toracicas, ppl-pp5 extr. abdominales, te-telson, aa-aorta anterior, ap-aorta posterior, gi-glándula del intestino medio, os-ostium, es-espina, c-corazón, i-intestino, cg-cadena ganglionar.

LAMINA N°1



Esquema de la organizacion interna  
de la Larva Zoea (Original Siewing)

Postlarval: estadio en que las características del adulto van apareciendo, siendo este también considerado como megalopa.

De acuerdo a la antigua nomenclatura la larva Brachyura se forma del huevo como una prezoa que podría ser clasificada como una protozoa; que no presenta espinas toraxicas ni rostrum alargado, que si estan presentes en la zoea segun GURNEY.

### 3.1 LARVAS DEL ESTADIO ZOEAL (DECAPODA BRACHYURA)

Las zoeas extraídas de La Punta (Latitud S.12° 03' - Longitud W 77°08'), para el estudio histoquímico presentan las características de los Brachyura o cangrejos verdaderos; estos en su gran mayoría constan de cuatro espinas (rostral, dorsal y un par laterales), y el telson horquillado.

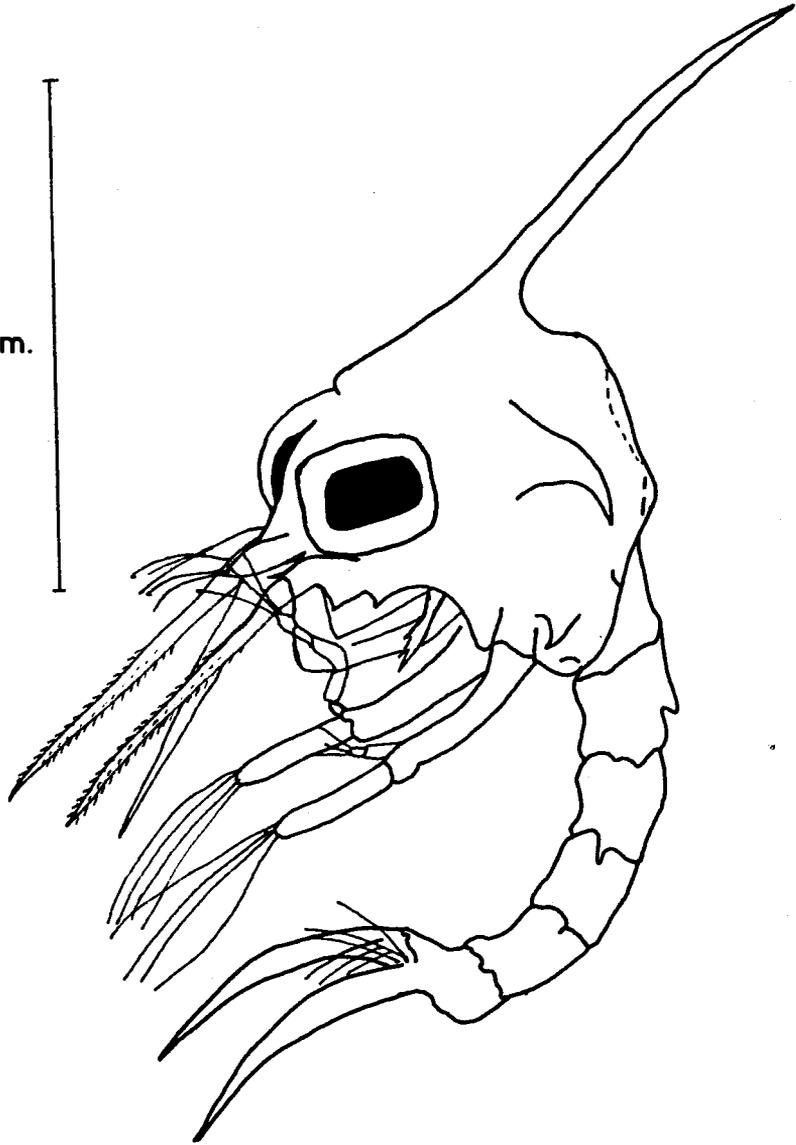
He revisado alrededor de cien ejemplares, y es así que las zoeas (Lámina N° 2) presentan los siguientes caracteres:

El caparacho de 0.50 mm de longitud (excluyendo las espinas), posee un total de cuatro espinas. La rostral esta anterior ventral y tangencialmente al caparacho. El par lateral cortas con las puntas hacia abajo y por último la dorsal. Todas las espinas terminan en punta. El



LAMINA N°2

1mm.



Vista lateral de la Zoea Brachyura

caparacho contiene unas pocas setas.

Las antenas (Fig. 1) son largas, delgadas y punteagudas, poseen varias hileras de pequeñas espinulas, en su extremo proximal las espinas presentan un anlage (x) de flagelo.

Las antenulas (Fig. 1) pequeñas sin segmentar, posee un penacho de tres o cuatro setas en su extremo distal.

El primer y segundo maxil ípedo desarrollados, el exopodo con cuatro setas plumosas. El tercer maxil ípedo rudimentario.

El abdomen (Fig. 2) consta de cinco somites libres agregados al telson, el segundo somite tiene un par de procesos espinosos en el margen postero-ventral; el tercer somite tiene un par de procesos espinosos más pequeños en el margen postero-ventral. El tercer, cuarto y quinto somite se extienden con un par de espinas pequeñas postero-laterales.

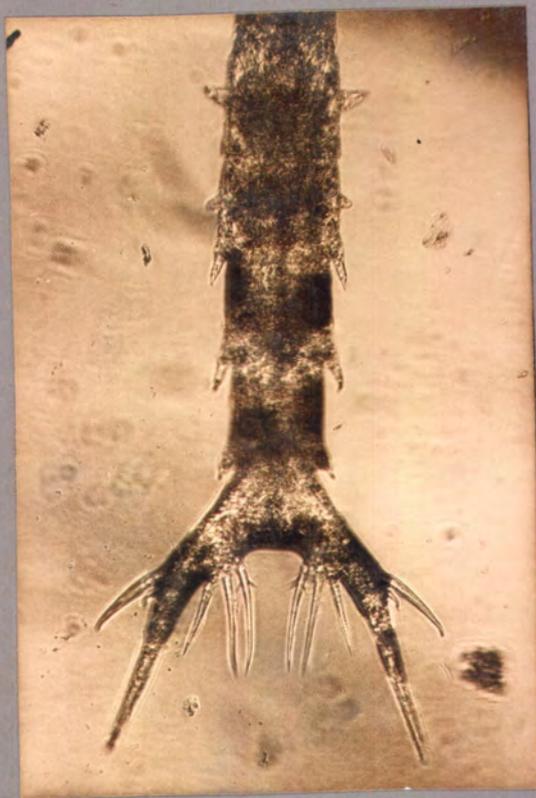
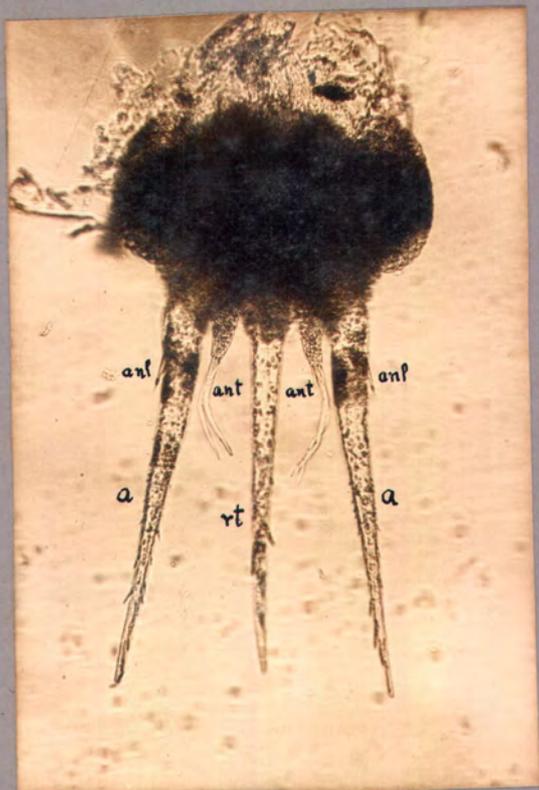
El telson (Fig. 2) en forma de tenedor u horquilla, presentando a cada lado de las espinas largas, una espina de menor tamaño, en cuyo ángulo se encuentra una pequeña espina y tres espinas interiores con setas pequeñas. Todas estas espinas son punteagudas.

---

(x) anlage: esbozo de un futuro órgano en forma de flagelo. Según GURNEY (1942) exopodo que caracteriza a larvas de Familia Xanthidae.

Fig. 1.- Vista anterior del cefalotorax : a-antena,  
rt-rostrum, ant-antenula, anl-esbozo de flagelo (940X)

Fig, 2.- Vista ventral del abdomen y telson (900X)



#### 4. BREVES DATOS ECOLOGICOS

Los organismos planctónicos presentan modificaciones morfológicas en su desarrollo, contrarrestando de esta forma serios peligros para poder sobrevivir.

##### 4.1.- FLOTACION

Acción por la cual el plancton puede llegar hasta ciertas profundidades, pasadas las cuales estos organismos perecerían sino tuviesen estas estructuras modificadas, que si bien no paralizan el hundimiento por lo menos lo retardan.

Algunas de estas modificaciones tienden a aumentar el área de superficie mediante espinas. Así entre las diatomeas tenemos Chaetoceros, Ceratium entre los Diniflagelados, algunos Foramníferos, Copepodos pelagicos como Calocalanus pavo; algunos huevos de copepodos y peces estan provistos de numerosas espinas. Entre los Crustaceos los estadios larvarios de Sergestes y de los Porcellanidae como de las zoeas de los Brachyura presentan proyecciones espinosas.

Otros organismos tienen modificaciones en forma de aguja larga, hundiéndose muy lentamente, si es que ellos estan horizontales, es el caso de algunos copepodos.

Otra resistencia al hundimiento sería la estructura exoesquelética muy delgada que tienen la mayoría de especies planctónicas como los Crustaceos.

Estas son algunas de las muchas modificaciones para flotar que presentan los organismos planctónicos.

#### 4.2. LOCOMOCION

Casi todos los organismos del zooplancton son capaces de realizar alguna forma de movimientos débiles, que pueden ser por cilios, flagelos o apéndices especializados.

Los estadios larvarios de los Crustaceos se movilizan ya sea por sus antenas, sus apéndices torácicos, estos más los apéndices abdominales conforme los estadios van desarrollándose.

Las zoeas se movilizan de dos formas, KNUDSEN (1960), la primera direccional avanzando en línea recta, natación normal siempre orientada en dirección a la espina dorsal, utilizando las setas plumosas de los maxilípedos como remos; la segunda forma es dando saltos y hundándose, movimiento que demuestra no tener dirección definida, ayudado por el telson y abdomen para esta natación de "brincos".

#### 4.3. MIGRACIONES VERTICALES

Muchos organismos planctónicos realizan migraciones verticales diurnas o nocturnas, ya que durante el día buscando la luz suben a las capas superficiales o huyen de estas buscando la oscuridad del fondo. Naturalmente que esto sería un simple caso de fototropismo, pero no es el único estímulo, pueden ser debido a cambios de: temperatura, interacción de fototropismo y geotropismo, búsqueda de alimento. Sucede en algunos casos que los estadios larvarios buscan la luz del día mientras los estadios juveniles y adultos la oscuridad.

MAST (1938) demostró que organismos con órganos locomotores y fotoreceptores bilaterales eran fotopositivos.

KNUDSEN (1960) hizo pruebas con zoeas de la familia Xanthidae y demostró que la luz atrae a las zoeas; incluso pudo tomar la velocidad de natación para un metro siendo un foco de luz el medio para el movimiento en línea recta de la zoea.

#### 4.4. PROTECCION Y ENEMIGOS

Los organismos del plancton tienen estructuras modificadas que le sirven de protección frente a enemigos; durante su desarrollo o metamorfosis pueden perderla, vol

viéndose vulnerables para herbívoros y predadores.

Las espinas que le sirven para flotar a las diatomeas pueden servir de protección contra copepodos, ya que estos prefieren diatomeas no espinosas. Otras larvas como los poliquetos desarrollan espinas especiales protectoras. Otros son extremadamente transparentes como los quetognatas.

A pesar de estas y muchas otras modificaciones especiales las larvas pelagiales de cangrejos y otros animales como componentes de fitoplancton son fuentes de alimentación debido a su gran pequeñez.

Los peces planctívoros y ballenas de barbas, poseen filtros con los que pueden hacer una selección de estos organismos como pequeñísimos crustaceos (bonito, arenques), y aun estos organismos se devoran entre ellos u otros más pequeños, KNUDSEN (1960) comprobó en el laboratorio que las zoeas y megalopas se alimentan frecuentemente de otra zoea, incluso zoeas I fueron vista comiendo la espina dorsal de otra zoea viva.

#### 4.5. ALIMENTACION

Muchos organismos subsisten utilizando los disolventes de material inorgánico.

El fitoplancton tiene una nutrición holofítica.

El zooplancton se puede alimentan mediante fil tros, que haciendo corrientes atraen los alimentos que pueden ser diatomeas, detritus. Otros organismos se alimentan de sedimentos es el caso de muchos rotíferos. La gran mayoría son predadores o sea que capturan sus presas vivas utilizando tentáculos o apéndices especializados.

LEBOUR (1928), en su medio natural las zoeas componen su dieta de diatomeas, otras algas microscópicas, larvas y pequeños animales adultos.

KNUDSEN (1960), en el laboratorio alimentó a las zoeas con alimentos mixtos de protozoarios, turbelarios, diatomeas y nauplius de Artemia, y otros habitantes de acuarios.

ROY (1962), alimentó a las zoeas con larvas de Artemia.

#### 4.6. ECDYSIS Y MORTALIDAD

Ecdysis época en que la coraza vieja es eliminada para dar paso a una nueva que se ajusta al nuevo tamaño del animal en desarrollo.

Los Brachyura en su gran mayoría poseen cuatro estadios larvarios de zoeas presentándose la ecdysis al término de cada estadio.

KNUDSEN (1960), observó en el laboratorio los períodos de muda con una crecida mortalidad, siendo la mu

da del primer al segundo estadio zoea, el mas crítico; durante el acto de muda una gran energía es consumida en la tentativa de dejar en libertad a la vieja cubierta.

El proceso de ecdysis es el mismo para las larvas y adultos (KNUDSEN, (1957)). La zoea escapa por una resquebrajadura, en la vieja caparazón, siendo los ojos antenas y espina rostral los últimos en mudar.

Aparte de la mortandad observada por KNUDSEN (1960) en el laboratorio durante la muda (acción que posiblemente ocurra en su medio normal de vida), esta estaría condicionada a las modificaciones ambientales donde viven los cangrejos y sus crias, que repercutirían en la población de adultos.

## 5. OXIDACIONES BIOLÓGICAS, LAS DESHIDROGENASAS

Las oxidaciones biológicas enzimáticas están consideradas como un mecanismo, por el cual el oxígeno molecular traído a la célula, es capaz de oxidar sustancias dentro de las células (metabolitos). El oxígeno molecular por si mismo es incapaz de tales oxidaciones, tienen que intervenir ciertos catalizadores, ciertas enzimas que catalicen la reacción.

Es así que ocurre la Activación del Oxígeno, una de las teorías relativas a la oxidación biológica está envuelta de una activación molecular catalizadora en exígeno activo o atómico.

Esta teoría da énfasis a la importancia de la actividad del oxígeno, pero descarta la necesidad de activar el metabolito.

Fue en 1927, WARBURG postuló tal activación del exígeno basándose en su descubrimiento de la enzima respiratoria, según WARBURG, el cual es responsable principal de la reacción siendo primero oxidado y entonces reducido.

Sobre la activación del hidrógeno, el avance producido debe a los trabajos de WIELAND. Su trabajo tiene gran rol en el entendimiento de las oxidaciones biológicas. Según WIELAND la presencia de una enzima conveniente (comunmente llamada deshidrogenasa), ciertos átomos de

hidrógeno en el metabolito son activados y separados. En orden que la reacción puede continuar el hidrógeno liberado tiene que ser removido continuamente. En la mayoría de los casos el hidrógeno es pasado de uno o mas transportadores antes éste sea finalmente oxidado.

Por último tenemos la Activación del Hidrógeno y Oxígeno, para que exista una oxidación biológica es necesario que ambos, el hidrógeno del metabolito, y el oxígeno sean activados. Esto es probable en la mayoría de los casos. Pero para que esta teoría tenga una total aplicación y sea posible se debe considerar a los transportadores esenciales para este sistema, o sea, que antes que el hidrógeno pueda ser transferido a oxígeno este debe ser transportado por uno o mas sustancias.

Los transportadores de hidrógeno son sustancias presentes en la célula pueden aceptar el hidrógeno y también ser reducidos y oxidados de nuevo.

En la extracción del hidrógeno del metabolito la enzima verdadera conocida como una deshidrogenasa debe estar presente.

Las deshidrogenasas son enzimas proteicas de acción específica, las cuales funcionan ya sea con la coenzima I (DPN) o II (TPN). El hidrógeno desprendido del metabolito en presencia de la deshidrogenasa se combina con una de las coenzimas, en este caso no solamente la coenzi-

ma también es un transportador, sino que lo especial de su presencia es la cooperación de ésta con la enzima.

El proceso enzimático puede progresar a través de un número indefinido de etapas, cada una de las cuales comporta una transferencia de hidrógeno, pero que además permite la liberación de cierta cantidad de energía.

Es importante consignar que las enzimas y coenzimas que realizan la función de transportadores de hidrógenos y electrones en la cadena respiratoria, se encuentran localizados en las mitocondrias.

Las deshidrogenasas se pueden dividir en :

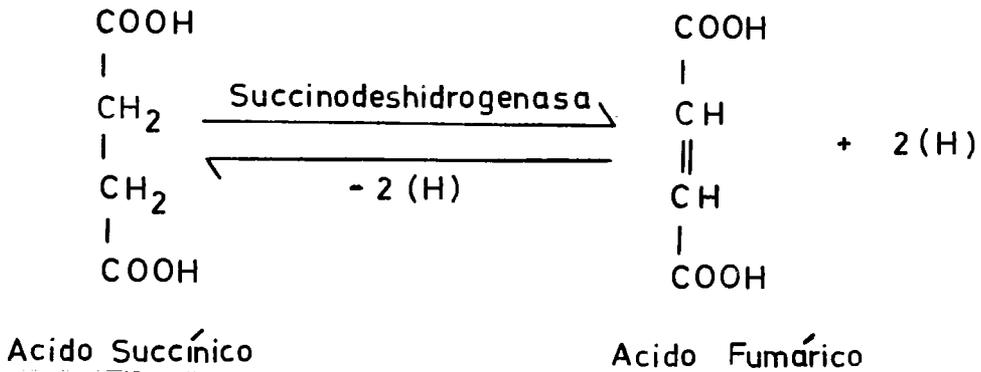
- Riboflavina deshidrogenasas. Siendo las coenzimas FMN o FAD.

- Piridin Nucleótido deshidrogenasas. Conteniendo DPN o TPN como coenzimas.

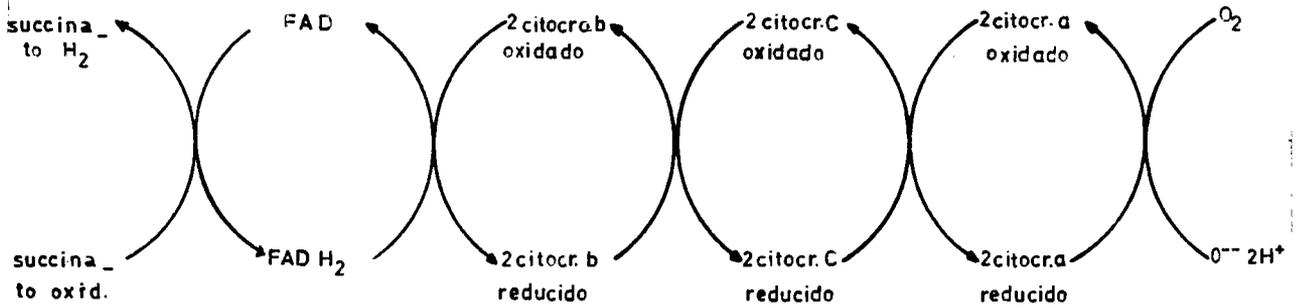
- Citrocomo C enzimas reductoras. Ejemplos son la Succinodeshidrogenasa, la que convierte el ácido succínico a fumárico.

### 5.1. LA SUCCINODESHIDROGENASA.

Enzima ampliamente distribuida en plantas inferiores, superiores como también en animales; catalizando y estableciendo el equilibrio entre los ácidos succínico y fumárico.

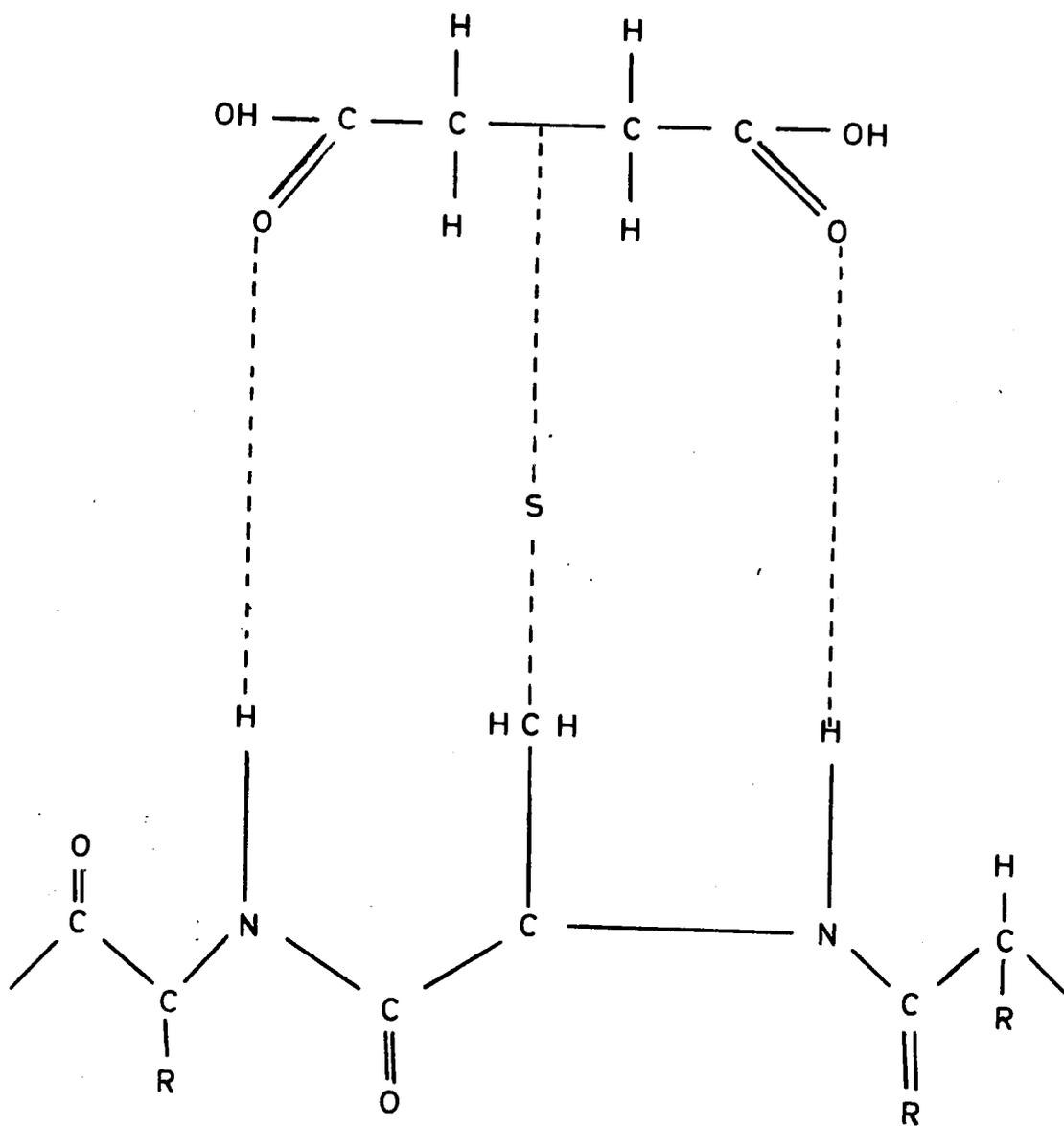


La SDH igual que otras enzimas provoca la deshidrogenación de sus substratos empleando el sistema Flavina sin ningún otro aceptor de hidrógeno, siendo después oxidada por el citocromo b, de modo que puede aceptarse que el citocromo b es parte integrante de la SDH



La SDH se obtiene al estado soluble, pero su purificación no es definitiva, su grupo prostético no se conoce con exactitud, sus propiedades proteínicas no son muy bien conocidas, lo mismo que su mecanismo de acción.

La SDH es una flavoproteína, pero la flavina li



Formula desarrollada de la Succinodeshidrogenasa

berada por acción proteolítica no se identifica con las flavinas conocidas.

El hierro está presente en todos los preparados pero se ignora el papel que desempeña en la enzima. La actividad de la enzima varía con la tasa de hierro en la etapa succinato-fumarato.

La estructura química de la enzima no está aún definitivamente determinada. Se sabe que encierra grupos SH cuya presencia es indispensable para su actividad enzimática. El ácido succínico se fija por los carboxilos a dos grupos amida de un núcleo peptídico, y que los hidrogenos del mismo ácido succínico estarían ligados al grupo Thiol.

#### 5.1.1. Situación de la Succinodeshidrogenasa en el Ciclo del ácido cítrico.

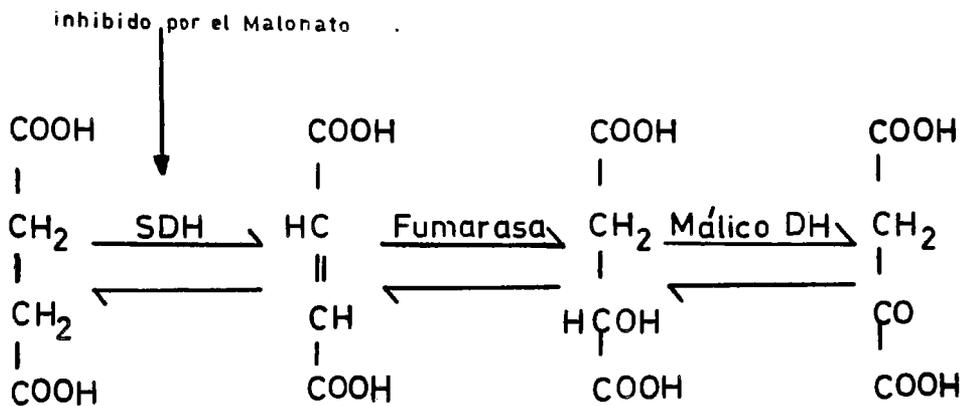
El proceso de transformación energética de los alimentos, incluye el ingreso de éstos al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de KREBS o del ácido cítrico.

Es aquí donde la acción catalizadora de las enzimas deshidrogenasas permite la remoción de átomos de hidrógeno. Entre estas enzimas se ubica la SDH, la cual es responsable de la oxidación del ácido succínico.

La deducción de este proceso avanzó con los ex-

perimentos de SZENT-GYORGI con sus trabajos en músculo de paloma, sugirieron, que estos sistemas enzimáticos, diferentes tenían un efecto catalítico sobre la respiración aeróbica del tejido muscular.

La importancia del sistema succino-deshidrogenasa fué subrayada por el hecho de que la adición de malonato inhibe el efecto catalítico de cualquiera de estos ácidos dicarboxílicos tetracarbonados. Se supuso que estos compuestos sufrían una interconversión de acuerdo con la secuencia de reacciones enzimáticas.



Acido Succínico    Acido Fumárico    Acido Málico    Acido Oxalacético

Con los trabajos de KREBS se demostró que la respiración del músculo pectoral de paloma; no aumentaba solamente por la adición de los ácidos tetracarbonados si no también por otras sustancias tales como el ácido cítrico, el α-cetoglutárico, pirúvico etc.

KREBS en 1937 propuso un ciclo metabólico en el que intervenía como intermediario el ácido cítrico. Sien-

do el efecto catalítico del ácido cítrico del mismo grado que del ácido succínico y el de los otros ácidos dicarboxílicos tetracarboxilados.

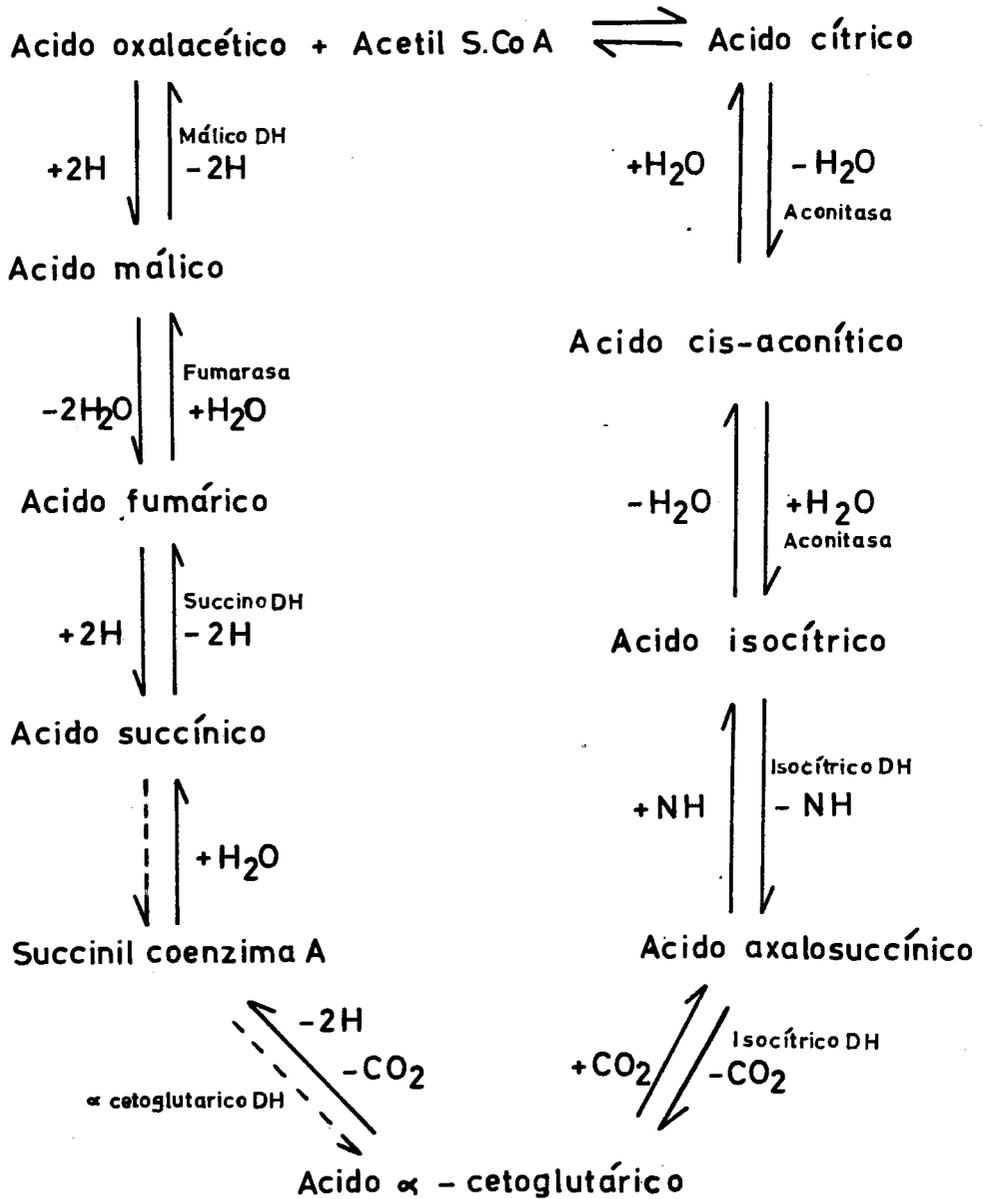
Los pasajes son los siguientes: el ácido cítrico es catalizado por la enzima aconitasa, transformándolo en ácido cis-acónitico y este en ácido d-isocítrico, este ácido es catalizado por la enzima isocítrico deshidrogenasa y se convierte en ácido oxalsuccínico, en este caso la enzima actúa como oxidante y esta misma actuando como decarboxilasa del ácido oxalsuccínico lo transforme en ácido  $\alpha$ -cetoglutárico el que por acción de decarboxilación oxidativa produce la succinil coenzima A, a partir de la cual se forma el ácido succínico.

El ácido succínico es oxidado en un proceso reversible por la SDH con formación de ácido fumárico, éste es transformado en ácido L-málico por la acción catalizadora de la enzima málico deshidrogenasa que lo convierte en ácido oxal-acético.

Por lo que se deduce que las reacciones consisten en la descarboxilación y oxidación sucesivas.

Una característica metabólica importante del ciclo del ácido cítrico es que el equilibrio en la descarboxilación oxidativa del ácido  $\alpha$ -cetoglutárico está tan desplazado en la dirección del ácido succínico que este ciclo es esencialmente monodireccional.

KREBS señaló que varios ciclos metabólicos tie-



Ciclo del ácido cítrico o de los ácidos tricarboxílicos

nen una o mas reacciones irreversibles. Es posible que la regulación de la velocidad de tales reacciones irreversibles determine la actividad fisiológica de algunos ciclos y sea un factor importante en el mantenimiento de los niveles estacionarios de los metabolitos.

## 5.2. DETECTORES DE LA OXIDACION BIOLOGICA

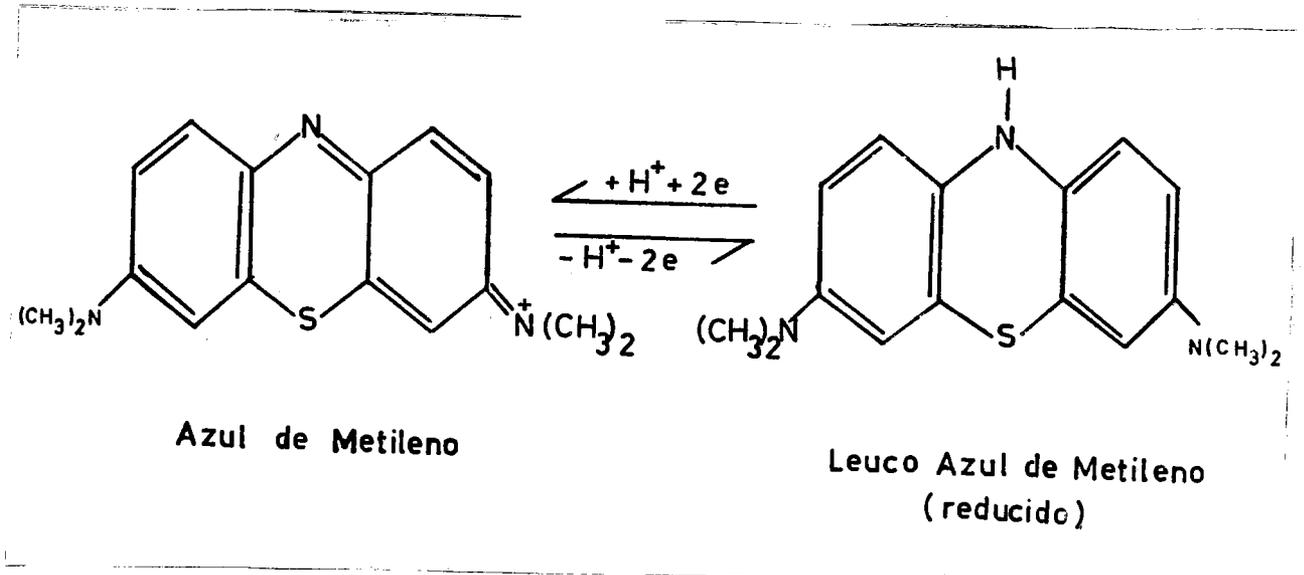
### 5.2.1. Azul de Metileno

El azul de metileno reacciona como aceptor de hidrógeno y así lo usó WIELAND que interpretó el fenómeno de las oxidaciones celulares, al demostrar que lo importante de la oxidación es el transporte de hidrógeno desde la sustancia aceptora, que se reduce.

Como aceptor de hidrógenos se usa el azul de metileno, colorante que al hidrogenarse se decolora. De esta manera cumple también la función de indicador del proceso de oxidación. Según la velocidad con que se produce la decoloración puede obtenerse una indicación cuantitativa de la actividad deshidrogenásica.

El azul de metileno puede actuar como aceptor definitivo de los hidrogenos provenientes de la oxidación de un substrato, reemplazando así al oxígeno. El azul de metileno recibe los hidrogenos desde una flavoproteína llamada diaforasa, que hace de intermediaria entre el nú

cleotido piridínico y el colorante.



### 5.2.2. Las Sales de Tetrazolium, el Nitro BT

Son un grupo de compuestos conocidos como sales de tetrazolium ó tetrazoles; tienen una misma estructura básica, con gran aplicación en la histoquímica, particularmente en la localización del sistema de enzimas oxidativas.

Las sales de tetrazolium son incoloras, soluble en agua, pero las formas reducidas se colorean profundamente en pigmentos insolubles en agua, conocidos como formazanes.

El uso de las sales de tetrazolium varía considerando las siguientes características: sensibilidad a la luz, tamaño del cristal de formazan, solubilidad en grasas y alta reducción.

Es así que las sales de tetrazolium se usa para la demostración histoquímica de las enzimas oxidativas, tales como: Succionodeshidrogenasa, Citocromo oxidasa, Monoamino oxidasa, otras como DPN y TPN del sistema diaforasas han sido ya establecidas.

El Nitro Blue de Tetrazolium o Nitro BT, ditetrazolium que fue introducido por NACHLAS en 1957 y desde su aparición se ha convertido en una de las sales de tetrazolium más usadas. Se han encontrado aplicaciones en todas las demostraciones histoquímicas de los sistemas de enzimas oxidativas (NACHLAS en 1958).

Usando este compuesto muchos investigadores han descrito la localización en las mitocondrias de estos sistemas enzimáticos.

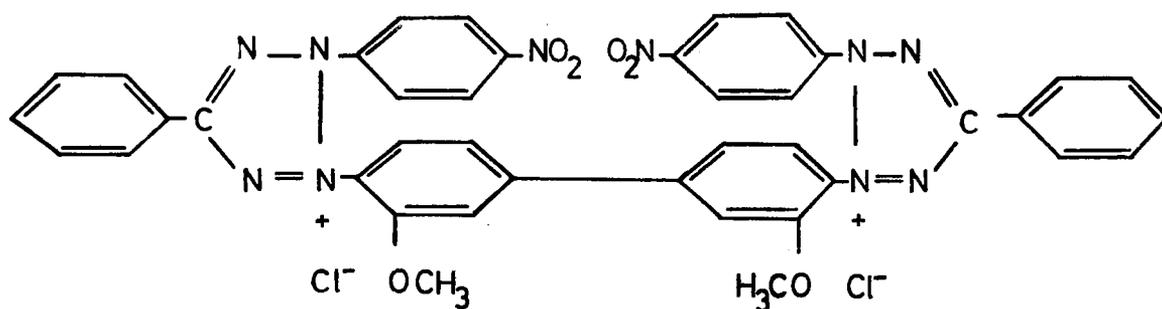
El tetrazolium es rápidamente reducido y forma un precipitado puro y fino de color azul que es el formazan; el cual es insoluble en grasas y se muestra no sensible a la luz.

Los cristales de diformazan en masas toma las formas de gotas lípidas probablemente como resultado del movimiento del formazan en interfases lipido-acuoso.

Una características de los diformazanes no encontrados en formazanes de otras sales de tetrazolium utilizadas, es su alto grado de sustentividad, permitiendo la deshidratación y el montaje de secciones de tejido

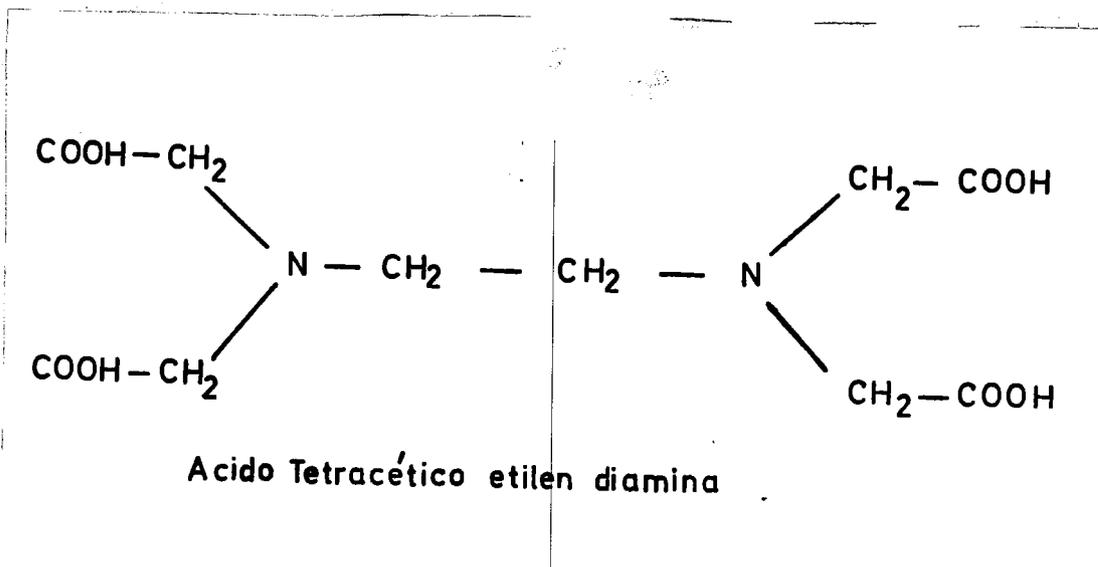
en medios no acuosos.

El monoformazan da un color violeta oscuro, es altamente soluble en grasas.



### 5.3. EL ACIDO TETRACETICO ETILEN DIAMINA (EDTA)

Por los trabajos de KARNOVSKY y HIMMELHECH, se indica que el Edta ejerce cierta acción en el comportamiento de la enzima deshidrogenasa en la reacción histoquímica; y aplicándola en la bioquímica, se le atribuye un mecanismo consistente en una quelación del derivado etilen diamina con metales pesados existentes en el tejido, que ocasionarían cierto grado de inhibición de la enzima. De tal modo que el Edta bloqueando las trazas de metales pesados favorecería para que la reacción se presente en mayor grado.



6. RESULTADOS DE LA INVESTIGACION BIOQUIMICA  
DE LA SUCCINODESHIDROGENASA

La aplicación del método bioquímico sobre el homogenizado de zoeas dio buen resultado, aunque con alguna dificultad debido a la pequeña cantidad de material biológico disponible.

En el caso de la investigación de la actividad enzimática con el Azul de Metileno. Se utilizó el Azul de Metileno 10 mg% en agua destilada, pruebas que la lectura del fotocolorímetro nos indico que no se había producido la reducción del Azul de Metileno. Las pruebas siguientes se realizaron con Azul de metileno 10 mg% en HCl 0.2 N dando igual resultado.

Se investigó con sales de tetrazolium (Cuadro N° 1), en esta oportunidad con el Nitro BT mg/ml como aceptor de electrones manifestada en la lectura del fotocolorímetro, aunque cabe repetir una vez mas que el material con que se realizaron las pruebas fue pobre y en cantidad no constante.

CUADRO N° 1

(Gráfico 1)

MUESTRA	DENSIDAD OPTICA
1	165
2	158
3	163
4	113
5	113

Las muestras 4 y 5 constituyen muestras de referencias (blanco)

Utilizando el mismo reactivo Nitro BT (Cuadro N° 2 y N° 3) se continuo con la investigación de la acción del ácido tetracético etilen diamina (Edta) sobre la actividad enzimática de la Succinodeshidrogenasa. Las concentraciones del Edta fueron 0.01M, 0.001M, 0.0001M en las que dio mayor lectura de unidades Klett que en la reacción normal sin Edta.

CUADRO N° 2

(Gráfico 2)

MUESTRA	DENSIDAD OPTICA
1	26
2	29
3	29
4	--
5	11

CUADRO N° 3

(Gráfico 3)

MUESTRA	DENSIDAD OPTICA
1	27
2	38
3	43
4	--
5	9

Las lecturas de la muestra 4 en los cuadros 2 y 3 es la muestra de referencia ya substraída.

GRAFICO 1

Efecto de la concentración del  
Succinato sobre la actividad  
de la SDH en Plancton(ZOEAS)

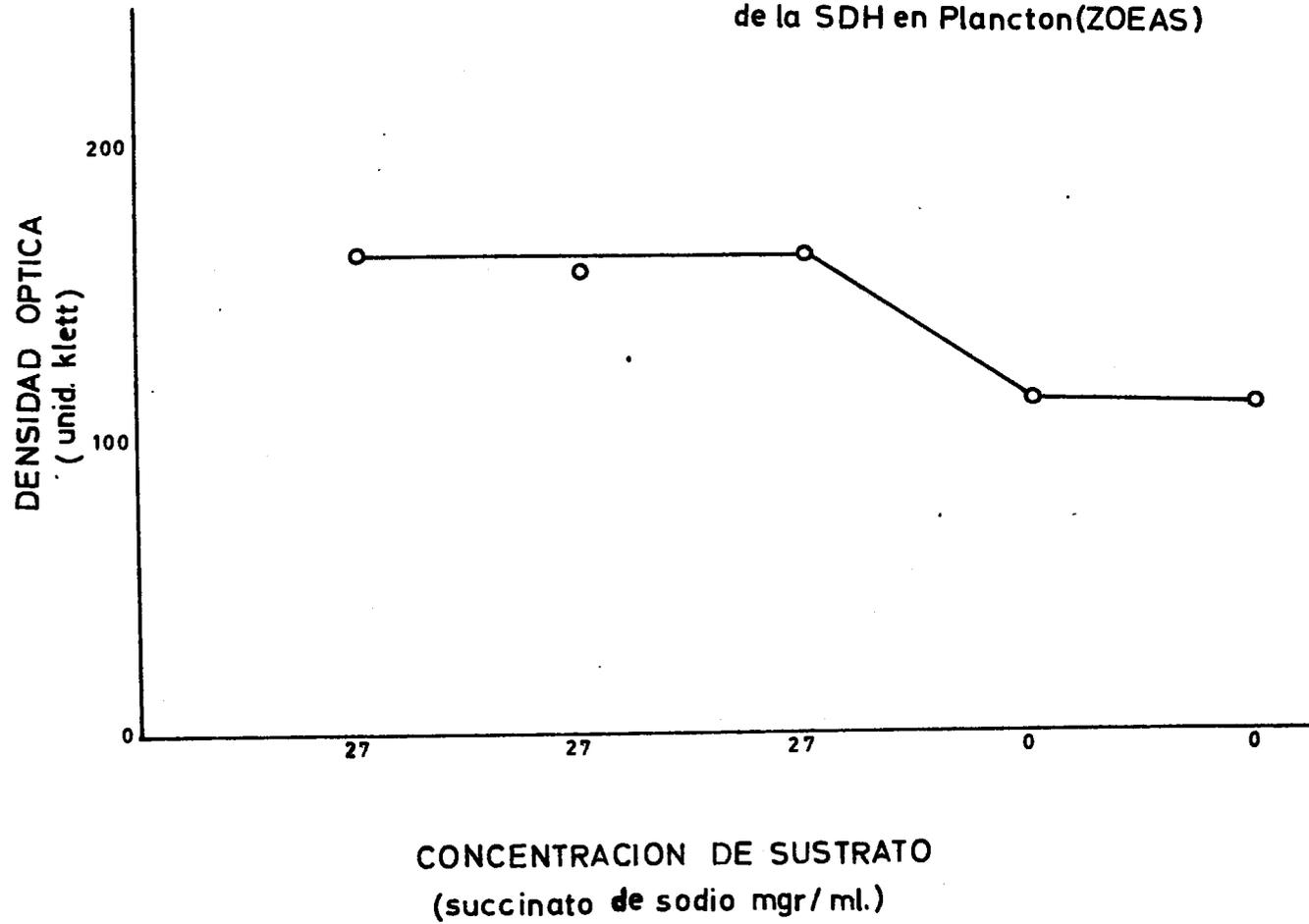


GRAFICO 2

Accion del EDTA sobre la actividad de la SDH en Plancton (ZOEAS)

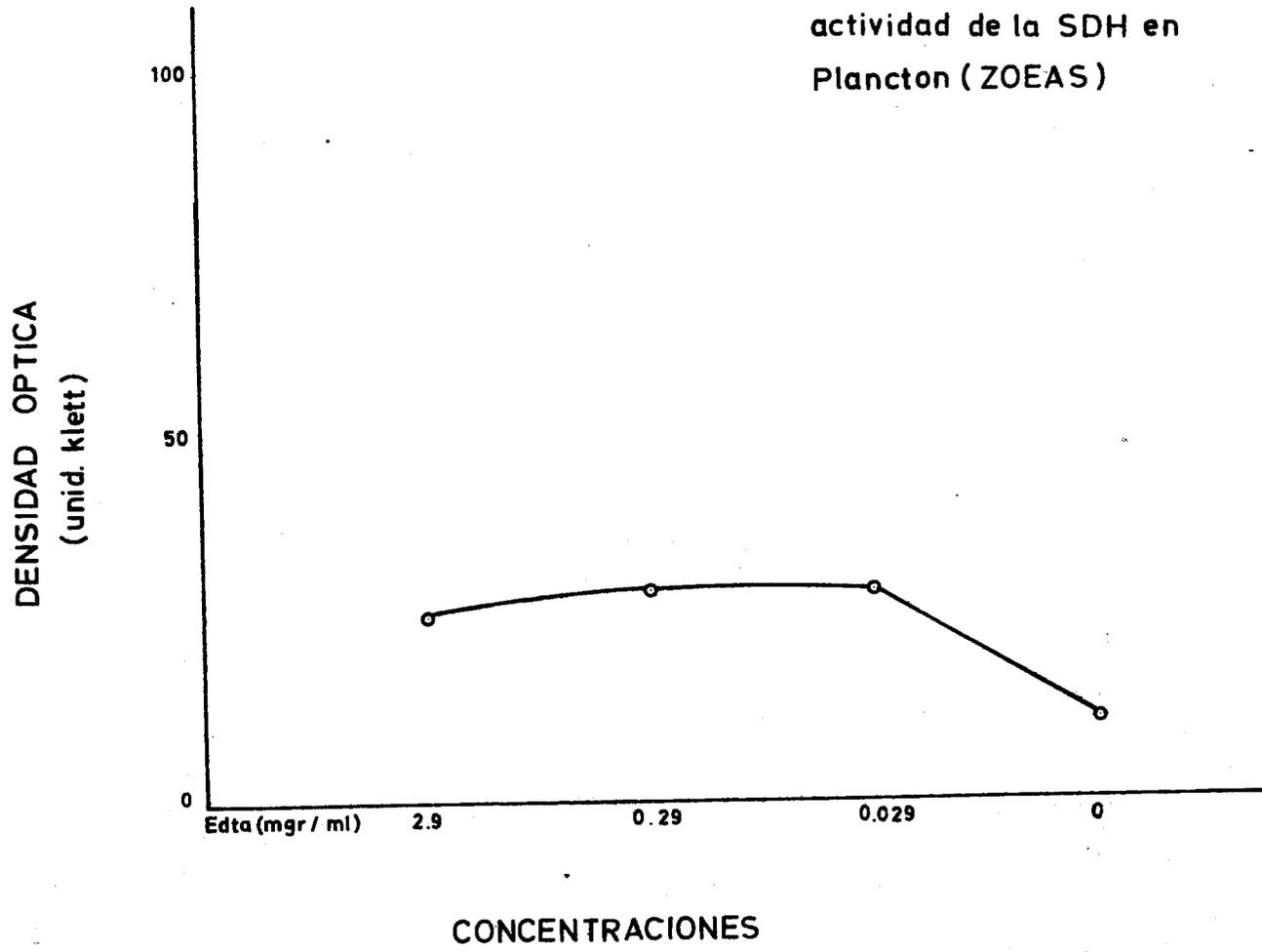
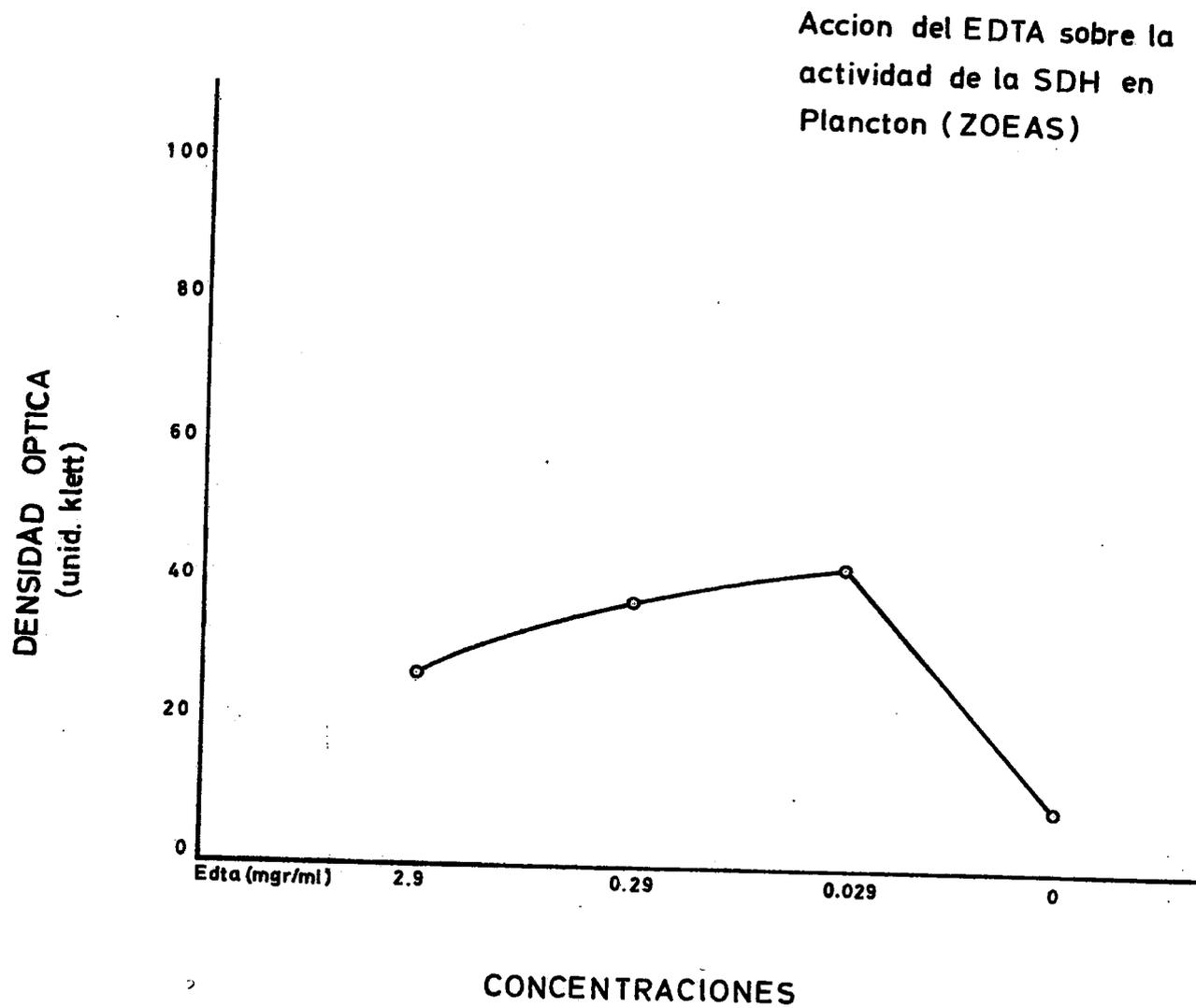


GRAFICO 3



7.- RESULTADOS DE LA INVESTIGACION HISTOQUIMICA  
DE LA SUCCINODESHIDROGENASA

Aplicando la técnica histoquímica de SELIGMAN y RUTENBERG para la reacción de la Succinodeshidrogenasa, se apreció una marcada reacción en el cefalotorax, región donde se encuentran los principales órganos como:

Corazón; órgano musculoso muy desarrollado que ocupa casi todo el carapacho, posee una gran actividad enzimática (+++). Fig. 3

Glándula del intestino medio de fuerte reacción como (+++). Fig. 3.

Las branquias primitivas situadas en la base de las extremidades toraxicas dio una reacción fuertemente positiva, debido a una gran actividad enzimática como (+++). Fig. 5.

Los músculos del cefalotorax, como las bases del rostrum y de los apéndices torácicos han dado una reacción que sería como (++) (+) respectivamente. Fig.3.

Los ojos compuestos dieron reacción negativa (-). Fig. 3.

El abdomen presentó una débil reacción, siendo el telson negativo. Fig. 4.

Distribución de la Actividad de la SDH en zoeas

Organo	Actividad
Corazón	+++
Glándula del Intestino medio.	+++
Branquias primitivas	+++
Abdomen (somites)	+
Ojos compuestos	-
Telson	-

Nota: La actividad de la Succinodeshidrogenasa fue apreciada en cruces de acuerdo al siguiente esquema que corresponde a la cantidad aproximada de formazán que se produce.

- : actividad negativa

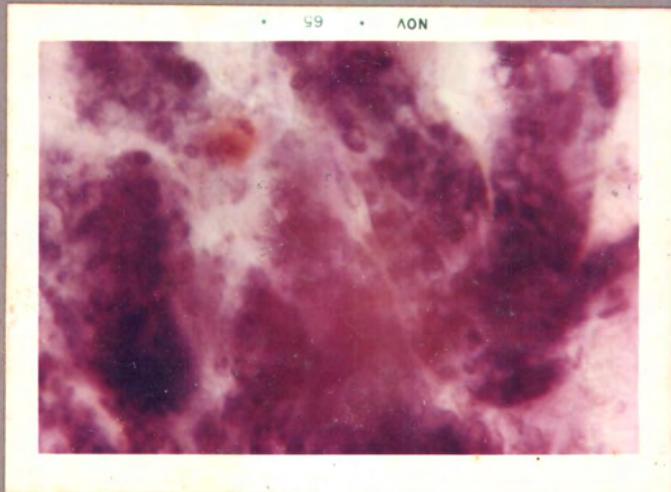
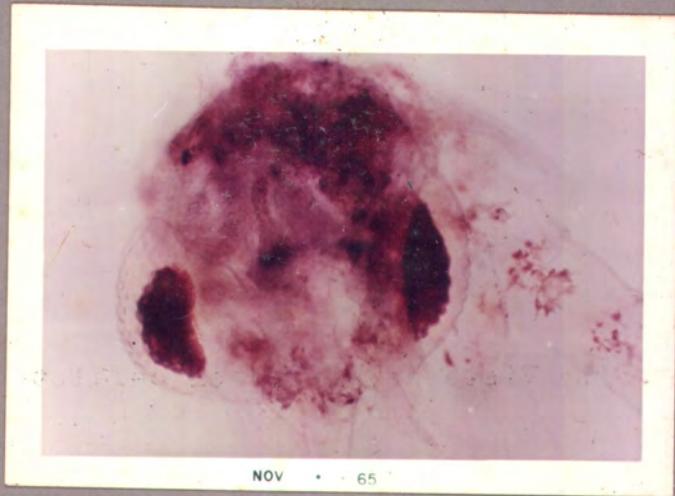
+ : actividad débil

+++ : intensa actividad

Fig. 3.- Vista anterior del cefalotorax (950X)

Fig. 4.- Vista de los últimos somites del abdomen y  
Telson (750X)

Fig. 5.- Vista de la base de maxilípedos con las bran-  
quias primitivas (1200X)



INSTITUTO DEL MAR DEL PERU  
BIBLIOTECA  
LA PUNTA - CALLAO

## 8. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1.- La presencia de la actividad de la Succinodeshidrogenasa en órganos de larvas del estadio zoea (Decapoda, Brachyura), ha sido investigada.
- 2.- Se aplicaron métodos bioquímicos e histoquímicos, utilizando como aceptores de hidrógeno al azul de metileno y sales de tetrazolium.
- 3.- El ácido tetracético etilen diamina fue usado como captador de metales pesados, dejando libre mayor cantidad de enzima.
- 4.- La sal de tetrazolium en este caso el nitro BT, resultó muy superior en cuanto a sensibilidad comparada con el azul de metileno.
- 5.- La utilización del ácido tetracético etilen diamina aumentó la actividad de la Succinodeshidrogenasa comparada con muestra control.
- 6.- Se encontró marcada actividad en el corazón, glándula del intestino medio, branquias primitivas
- 7.- Recomendamos la utilización de las sales de tetrazolium para ambos métodos de estudio bioquímico e histoquímico.

10. BIBLIOGRAFIA

- BONNER, J. 1950.- Plant Biochemistry  
Acad. Press. N.Y.
- CONN, H.J. 1961.- Biological Stains.  
Baltimore, M.D.U.S.A.
- CHATTERJEE P. & MITRA S. 1962.- Nucleolar localization  
of succinic dehydrogenase. J. Histo and Cytoche  
mistry Vol. 10 N° 1.
- DAVIS, C. 1955.- The Marine and Fresh- Water Plankton.  
Michigan State University Press. USA.
- Deulofen, V. & MARENZI, A.D. 1960.- Curso de Química Bio-  
lógica. Ed. Ateneo. Buenos Aires. Argentina.
- FOXON, E.H. 1934.- Notes on the swimming methods and ha  
bits of certain crustacean larvae. J. Mar. Biol.  
Ass. N,S, 19: 829-849.
- FRUTON, J.S. 1959.- General Biochemistry.  
Chapman & Hall. London.
- HARROW, PH. & MAZUR A. 1958.- Textbook of Biochemistry.  
Saund. Com 7th. Philadelphia, London.
- HOOD R.M. 1962.- Studies on the larval Development of  
Rithoropanopeus harrisii (Gould) of the family  
Xanthidae (Brachyura). Gulf Research Reports  
Vol N° 3 Miss. USA.
- GURNEY, R. 1942.- Larvae of Decapod Crustacea.  
Ray Soc. London.
- KNUDSEN, J.W. 1957.- The act of molting in the California  
Xanthidae, the pebble crabs. Bull. Sth. Calif.  
Acad. Scie. 56(3): 133-142.
- LAGUNA, J. 1960.- Bioquímica. Ed. Fournier S.A. México.
- LEBOUR, M.V. 1928.- The larval stages of the Plymouth  
Brachyura. Proc. Zool. Soc. London.

- LIMBAUGH, C. 1955.- Fish life in the kelp beds and the effects of kelp harvesting. Univ. Calif. Inst. Mar. Res. I.M.R. reference no. 55-9. La Jolla. Calif.
- MAST, S.O. 1938.- Factors involved in the process of Orientation of lower organisms to light. Biol. Rev. 13 (2)
- MITCHELL, P.H. 1956.- Bioquímica. Ed. Salvat S.A. España.
- NACHLAS M, & SELIGMA A. 1960.- Variations in reduction of Tetrazolium salts by dehydrogenase systems. Proceeding of Society for Exp. Biol, and Med. Vol.104
- NIEMEYER, H. 1962.- Bioquímica General. Ed. Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- PEARSE, A.G.E. 1960.- Histochemical theoretical and Applied. The Churchill Lyt. London.
- PETERSON, W.H. & STRONG F. 1960.- General Biochemistry Prentice-Hall, Inc. Eng, Cliffs, N.J.
- REMANE, A. 1957.- Arthropoda-Gliedertiere. Akad. Ver. Athenaion. Germany.
- SELIGMAN A.M. & RUTENBURG, A. 1951.- The Histochemical demonstration succinic dehydrogenase. Science N° 113, 317-320.
- SIEWING, R. 1956.- Untersuchungen zur Morphologie der Malacostraca (Crustacea): In. Zool.Jb. (Anat) 75.
- TAPIA FRESES, A & MIMBELA E. 1961.- Acción del Acido tetracético etilen diamina (Edta) sobre la reacción Gomori-Takamatsu para Fosfatasa alcalina. Reimp. Bol. Soc. Quim. del Perú. Vol XXVII.- N° 2.
- WILLIAMSON, D.I. 1957.- Crustacea, Decapoda: Larvae. I General Zooplankton-Sheet 67. Conseil Int. Pour L'Explor. de la Mer.

Impreso y Empastado en

M I M E O C O P I A S

Camaná 677 - Of. 3