

Spatial and temporal variability of oxidative stress indicators in the red crab (*Pleuroncodes planipes*) from the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico

Variación espaciotemporal de los indicadores de estrés oxidativo en la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) de la costa occidental de la península de Baja California, México

Orlando Martínez-Canto, Norma Olimpia Olguín-Monroy, Juan Antonio de Anda-Montañez, Tania Zenteno-Savín*

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC (CIBNOR), Instituto Politécnico Nacional, No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz 23096, Baja California Sur, México.

* Corresponding author. E-mail: tzenteno04@cibnor.mx

ABSTRACT. The red crab *Pleuroncodes planipes* is a resource with the potential for commercial exploitation. Red crabs have an elevated antioxidant capacity, which is subject to spatial and temporal variability. The objective of this study was to evaluate the variability of the oxidative stress indicators in *P. planipes* collected on four research cruises off the western coast of the Baja California Peninsula (Mexico). Superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) production, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activities were quantified in muscle and hepatopancreas of the collected specimens. Significantly higher $O_2^{\cdot-}$ production and antioxidant enzyme activities were found in hepatopancreas than in muscle ($P < 0.05$), which reflects the specific function of each tissue. Statistically significant differences ($P < 0.05$) in oxidative stress indicators were found among sampling stations. The results suggest that *P. planipes* is more susceptible to oxidative damage when sea temperature is warmer, particularly during El Niño conditions.

Key words: antioxidants, oxidative damage, oxidative stress, red crab, reactive oxygen species.

RESUMEN. La langostilla *Pleuroncodes planipes* es un recurso con potencial de explotación. Las langostillas tienen una elevada capacidad antioxidante, la cual está sujeta a variaciones espaciotemporales. El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad de los indicadores de estrés oxidativo en *P. planipes* recolectada en cuatro cruceros de investigación a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California (México). Se cuantificó la producción de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la peroxidación de lípidos y la actividad de las enzimas antioxidantes en el hepatopáncreas y músculo de las langostillas recolectadas. Se encontraron niveles significativamente mayores de producción de $O_2^{\cdot-}$ y actividad de las enzimas antioxidantes en el hepatopáncreas que en el músculo ($P < 0.05$), lo cual refleja la función específica de cada tejido. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los indicadores de estrés oxidativo entre las estaciones de muestreo. Los resultados sugieren que *P. planipes* es más susceptible al estrés oxidativo cuando la temperatura del mar es mayor, particularmente durante condiciones de El Niño.

Palabras clave: antioxidantes, daño oxidativo, estrés oxidativo, langostilla, especies reactivas de oxígeno.

INTRODUCTION

Since the mid-1980s the red crab *Pleuroncodes planipes* has been considered, given its abundance on the west coast of the Baja California Peninsula (Mexico), a resource with the potential for commercial exploitation in the region (Aurioles-Gamboa *et al.* 1995, Hernández-Llamas *et al.* 2006). The growing need for food and for using alternative, non-traditional resources has turned the attention of authorities, investors, and researchers towards this resource. Studies conducted to date on *P. planipes* address different aspects of distribution, abundance, larval drift, bathymetric migration, reproductive ecology, and feeding habits (Aurioles-Gamboa and Balart 1995, Robinson and Gómez-Aguirre 2004, Bazzino *et al.* 2010, Wehrmann *et al.* 2010). It has also been

INTRODUCCIÓN

Desde mediados de la década de los años ochenta, la langostilla *Pleuroncodes planipes* ha sido considerada, dada su abundancia en la costa occidental de la península de Baja California (México), un recurso potencialmente explotable en la región (Aurioles-Gamboa *et al.* 1995, Hernández-Llamas *et al.* 2006). La creciente necesidad de alimentos y de usar recursos no tradicionales alternativos ha suscitado el interés de tanto las autoridades como los inversionistas e investigadores por este recurso. Los estudios realizados a la fecha sobre *P. planipes* abarcan diferentes aspectos de su distribución, abundancia, deriva larval, migración batimétrica, ecología reproductiva y hábitos alimenticios (Aurioles-Gamboa y Balart 1995, Robinson y Gómez-Aguirre 2004,

reported that *P. planipes* has an elevated concentration of carotenoids and other antioxidant pigments (Castro-González *et al.* 1995, Vega-Villasante *et al.* 2002). However, to date no studies have been conducted on the main oxidative stress indicators in the red crab. The wide distribution of the red crab populations suggests that, as has been reported for other species, the antioxidant defenses and, therefore, the susceptibility to oxidative stress are subject to both spatial and temporal variability.

Oxidative stress is produced by a disturbance in the balance between prooxidants and antioxidants (Sies 1997). Such disruption can be initiated by an excessive production of reactive oxygen species (ROS) and/or a deficiency in the antioxidant defense mechanisms; in either case, the result jeopardizes the cell's structural and functional integrity (Halliwell and Gutteridge 2001, Ríos de Molina 2003). ROS are oxygen-derived molecules that easily react with other molecules and have a short half-life (Alessio and Hagerman 2006, Martínez-Cayueta 1998). ROS include free radicals, which contain unpaired electrons such as superoxide radical (O_2^-), and non-free radical molecules, such as hydrogen peroxide (H_2O_2). ROS are naturally formed in all aerobic cells and are now known to have a role as signaling molecules (Halliwell and Gutteridge 2001). While all organisms are susceptible to increasing ROS production by several endogenous and exogenous factors, they also possess numerous antioxidant mechanisms, including enzymes and small molecular-weight, non-enzymatic molecules (Halliwell and Gutteridge 2001, Ríos de Molina 2003). Among the antioxidant defenses are the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), and glutathione S-transferase (GST), as well as vitamins E and C, glutathione (GSH), and carotenoids, among others (Sies 1997).

Environmental factors such as ultraviolet radiation and changes in salinity or temperature alter the respiratory and metabolic rate and, thus, ROS production of crustaceans (reviewed in Fanjul-Moles and Gonsebatt 2012). Exposure to elevated temperatures accelerates ROS formation and induces antioxidant enzyme activities in marine ectotherms (Abele *et al.* 2002, Wilhelm-Filho *et al.* 2001b, Heise *et al.* 2003, Freire *et al.* 2012). Higher temperatures in summer are known to modulate the antioxidant defenses in several marine invertebrate species (Abele *et al.* 1998a, Freire *et al.* 2012). In addition, the high energy demands of reproduction and molting in crustaceans increase the risk of oxidative stress (reviewed in Fanjul-Moles and Gonsebatt 2012).

The objective of the present study was to evaluate the spatial and temporal variability of the oxidative stress indicators in *P. planipes* and its relationship with the environment along the west coast of the Baja California Peninsula. The hypothesis of the present study was that red crabs collected in warmer waters would have higher antioxidant enzyme activities and, thus, lower oxidative damage.

Bazzino *et al.* 2010, Wehrtmann *et al.* 2010). También se ha encontrado que *P. planipes* tiene una concentración elevada de carotenoides y otros pigmentos antioxidantes (Castro-González *et al.* 1995, Vega-Villasante *et al.* 2002). No obstante, no se han realizado estudios de los principales indicadores de estrés oxidativo en la langostilla. La amplia distribución de las poblaciones de *P. planipes* sugiere que, como ha sido documentado para otras especies, las defensas antioxidantes y, por tanto, la susceptibilidad al estrés oxidativo están sujetas a una variabilidad espacial y temporal.

El estrés oxidativo es el resultado de una perturbación del equilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes (Sies 1997). Tal perturbación puede ser causada por una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o por una deficiencia en los mecanismos de defensa antioxidante; en cualquier caso, el resultado compromete la integridad estructural y funcional de la célula (Halliwell y Gutteridge 2001, Ríos de Molina 2003). Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno que reaccionan fácilmente con otras moléculas y tienen una vida media corta (Alessio y Hagerman 2006, Martínez-Cayueta 1998). Las ERO incluyen radicales libres, que contienen electrones no apareados como el radical superóxido (O_2^-), y moléculas que no son radicales no libres, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ERO se forman naturalmente en todas las células aeróbicas y actualmente se sabe que actúan como moléculas de señalización (Halliwell y Gutteridge 2001). Aunque todos los organismos son susceptibles de aumentar la producción de ERO por varios factores endógenos y exógenos, también poseen numerosos mecanismos antioxidantes, incluyendo enzimas y moléculas no enzimáticas de bajo peso molecular (Halliwell y Gutteridge 2001, Ríos de Molina 2003). Entre las defensas antioxidantes se encuentran las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST), así como las vitaminas E y C, glutatión (GSH) y carotenoides, entre otros (Sies 1997).

Factores ambientales como la radiación ultravioleta y los cambios de salinidad y temperatura alteran la tasa respiratoria y metabólica y, por tanto, la producción de ERO de crustáceos (revisión en Fanjul-Moles y Gonsebatt 2012). Una exposición a temperaturas elevadas acelera la formación de ERO e induce la actividad de enzimas antioxidantes en organismos ectotermos marinos (Abele *et al.* 2002, Wilhelm-Filho *et al.* 2001b, Heise *et al.* 2003, Freire *et al.* 2012). Mayores temperaturas en verano modulan las defensas antioxidantes en varias especies de invertebrados marinos (Abele *et al.* 1998a, Freire *et al.* 2012). Además, las altas demandas energéticas asociadas con la reproducción y muda aumentan el riesgo de estrés oxidativo en crustáceos (revisión en Fanjul-Moles y Gonsebatt 2012).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la variabilidad espacial y temporal de los indicadores de estrés oxidativo en *P. planipes* y su relación con el ambiente a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California. La

MATERIAL AND METHODS

Study site

The study site is located in the oriental Pacific Ocean, on the west coast of the Baja California Peninsula (Mexico). Four cruises were conducted on board the research vessel *BIP XII*. The first cruise (C1) took place between 21 October and 10 November 2004 following an experimental sampling plan; the explored area ranged from latitude 23°35' N to latitude 28°30' N and from 20 to 311 m deep (fig. 1a). The second cruise (C2) took place from 15 to 29 March 2005 following a modified sampling plan, which was maintained in the next cruises. The third and fourth cruises (C3 and C4, respectively) took place from 21 November to 4 December 2006 and from 7 to 18 March 2007, respectively; the explored area ranged from latitude 23°3' N (Todos Santos) to latitude 28°51' N (Sebastián Vizcaino Bay) and from 41 to 433 m deep (fig. 1b).

A stratified random sampling design was used, with stations situated in lines perpendicular to the coast (13 transects for the first cruise and 12 transects for the next cruises), equidistant and of variable length depending on the bottom topography. At each sampling station bottom trawls were

hipótesis de trabajo fue que las langostillas recolectadas en aguas más cálidas presentarían una mayor actividad de enzimas antioxidantes y, por tanto, menor daño oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El sitio de estudio se localiza en el océano Pacífico oriental, en la costa occidental de la península de Baja California (México). Se realizaron cuatro cruceros a bordo del buque de investigación pesquera (BIP) *XII*. El primer crucero (C1) se realizó del 21 de octubre al 10 de noviembre de 2004 siguiendo un plan de muestreo experimental; el área muestreada abarcó de la latitud 23°35' N a la latitud 28°30' N y una profundidad de 20 a 311 m (fig. 1a). El segundo crucero (C2) se realizó del 15 al 29 de marzo de 2005 siguiendo un plan de muestreo modificado, el cual se mantuvo en los siguientes cruceros. El tercer crucero (C3) y el cuarto crucero (C4) se llevaron a cabo del 21 de noviembre al 4 de diciembre de 2006 y del 7 al 18 de marzo de 2007, respectivamente; el área muestreada abarcó de la latitud 23°3' N (Todos Santos) a la latitud 28°51' N (bahía de Sebastián Vizcaino) y una profundidad de 41 a 433 m (fig. 1b).

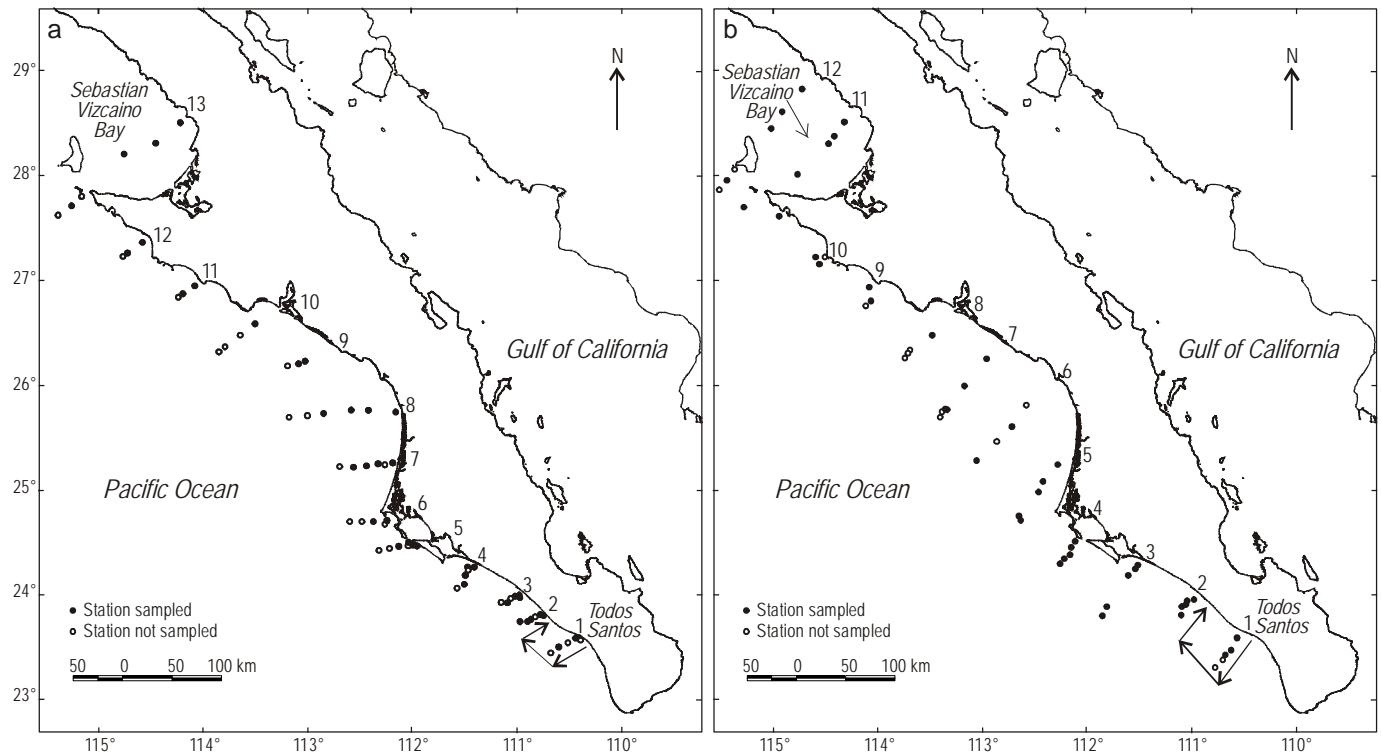


Figure 1. Sampling stations occupied during the research cruises conducted off the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico, (a) between October and November 2004 and (b) in March 2005, November 2006, and March 2007. Each number indicates a transect.

Figura 1. Estaciones de muestreo ocupadas durante los cruceros realizados a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California, México, (a) entre octubre y noviembre de 2004 y (b) en marzo de 2005, noviembre de 2006 y marzo de 2007. Los números denotan el transecto.

performed using a hybrid conical net with 34 m of upper head-rope for fish and crustaceans. The effective trawling time varied between 5 and 29 min, with an average of 17.5 min and 42 trawls per cruise. The effective trawling time is defined as the period elapsed between when the winch was stopped (the two steel otter boards touch the sea floor) and the net started ascending (the otter boards lift off the sea floor). Trawls were performed at an average speed of 2.6 nautical miles per hour. The total weight of red crab per haul was recorded, and from the catch on deck, approximately 5 kg of red crab were separated and immediately stored in the boat's freezer for posterior analysis. Once at the laboratory, samples were stored at -80°C until analyzed. Immediately prior to analyses and maintaining the samples on ice, muscle and hepatopancreas were separated from each individual. All biochemical analyses were performed in triplicate. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (San Luis, MO) and Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

Superoxide radical production

As an indicator of ROS production, the rate of superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) production was analyzed; $\text{O}_2^{\cdot-}$ production was quantified from the change of ferricytochrome *c* to ferrocytochrome *c* by following the method of Drossos *et al.* (1995), as previously described by Zenteno-Savín (2002) and Zenteno-Savín *et al.* (2006). Results are expressed in $\text{nmol O}_2^{\cdot-} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was quantified as an indicator of oxidative damage, by quantifying the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), according to the method described by Buege and Aust (1978). A standard curve was prepared with 1,1,2,3-tetraethoxypropane (TEP) in a range of 0 to 5 $\text{nmol } 250 \mu\text{L}^{-1}$. Results were obtained from the standard curve and are expressed in $\text{nmol mg}^{-1} \text{ protein}$.

Antioxidant enzyme activity

Prior to antioxidant enzyme activity analysis, 100 mg tissue (muscle or hepatopancreas) were homogenized in 2 mL phosphate buffer solution (500 mM), according to the methods described by Hermes-Lima and Storey (1995) and Hermes-Lima *et al.* (1998).

Total SOD activity was determined in a spectrophotometer (Jenway 6305 uv/vis) using the xanthine/xanthine oxidase system, which reduces nitroblue tetrazolium to yield formazan, according to the method described by Suzuki (2000). One unit of SOD activity is defined as the amount of enzyme needed to inhibit the reaction by 50%. To quantify CAT activity, the decrease in H_2O_2 concentration (initial concentration: 10 mM) was followed spectrophotometrically for 3.5 min

Se empleó un diseño de muestreo aleatorio estratificado, con las estaciones situadas en líneas perpendiculares a la costa (13 transectos para C1 y 12 transectos para C2, C3 y C4), equidistantes y de longitud variable según la topografía del fondo. En cada estación de muestreo se realizaron arrastres de fondo con una red cónica híbrida de 34 m de relinga superior para peces y crustáceos. El tiempo de arrastre efectivo varió de 5 a 29 min, con un promedio de 17.5 min y 42 arrastres por crucero. El tiempo de arrastre efectivo se define como el periodo transcurrido entre que se detiene el montacargas (las dos puertas de acero de la red tocan el fondo) y empieza a subir la red (las puertas se elevan del fondo). Los arrastres se realizaron a una velocidad promedio de 2.6 millas náuticas por hora. Se registró el peso total de *P. planipes* por arrastre y, de la captura a bordo, aproximadamente 5 kg de langostillas fueron separados y almacenados inmediatamente en el congelador del barco. En el laboratorio, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Inmediatamente antes del análisis y con las muestras sobre hielo, se separaron el hepatopáncreas y músculo de cada individuo. Todos los análisis bioquímicos se realizaron por triplicado. Los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (San Luis, MO) y Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

Producción del radical superóxido

Como un indicador de la producción de ERO, se analizó la tasa de producción del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), la cual se cuantificó a partir del cambio de ferricitocromo *c* a ferrocitocromo *c* siguiendo el método de Drossos *et al.* (1995), según la descripción de Zenteno-Savín (2002) y Zenteno-Savín *et al.* (2006). Los resultados se expresan en $\text{nmol O}_2^{\cdot-} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$.

Peroxidación lipídica

La peroxidación de lípidos se evaluó como un indicador de daño oxidativo. Se cuantificó la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés), según el método descrito por Buege y Aust (1978). Se preparó una curva estándar con 1,1,2,3-tetraetoxipropano (TEP) en un intervalo de 0 a 5 $\text{nmol } 250 \mu\text{L}^{-1}$. Los resultados fueron obtenidos de la curva estándar y expresados como $\text{nmol mg}^{-1} \text{ protein}$.

Actividad de las enzimas

Previo al análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes, se homogeneizaron 100 mg de tejido (músculo o hepato-páncreas) en 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos (500 mM), según los métodos descritos por Hermes-Lima y Storey (1995) y Hermes-Lima *et al.* (1998).

La actividad total de SOD se determinó en un espectrofotómetro (Jenway 6305 uv/vis) con el sistema de

(Aebi 1984). One unit of CAT activity is defined as the amount of enzyme needed to reduce 1 μM H_2O_2 per minute. GR activity was quantified following the decrease in absorbance during the oxidation of NADPH (Carlberg and Mannervik 1985, Goldberg and Spooner 1987). One unit of GR activity is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 μM NADPH per minute. GPx activity was measured according to Flohé and Günzler (1984), through the oxidation of NADPH. One unit of GPx activity is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 μM NADPH per minute. GST activity was determined following the method of Habig and Jakoby (1981). In this method the formation of the thioether glutathione dinitrobenzene complex, from the conjugation of GSH and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), is followed spectrophotometrically at 340 nm. One unit of GST activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the conjugation of 1 μM CDNB per minute at 25 °C. Antioxidant enzyme activity data are reported as units mg^{-1} protein.

Soluble proteins

Soluble protein concentration was quantified to standardize the results. This concentration was determined using a commercial kit (Bio-Rad) with serum bovine albumin as standard (Bradford 1976). Data are reported in mg mL^{-1} .

Statistical analysis

In order to test for statistical significance between means, analyses of variance (ANOVA) were performed (Zar 1996). *Post hoc* analyses (unequal N HSD) allowed us to test for the statistical significance of specific differences in particular parts of our design. Additionally, a forward stepwise discriminant function analysis was performed to determine which oxidative stress indicators ($\text{O}_2^{\cdot-}$, TBARS, SOD, CAT, GR, GPx, GST) allow for the best discrimination between the four analyzed cruises (exclude condition: muscle). The Statistica v8.0 software (StatSoft, <http://www.statsoft.com>) was used to run all statistical analyses.

RESULTS

Figure 1 shows the locations of all the sampling stations in the research cruises conducted from October to November 2004 (C1, fig. 1a) and in March 2005, November 2006, and March 2007 (C2, C3, C4; fig. 1b) off the west coast of the Baja California Peninsula. Figures 2 and 3 summarize the results for $\text{O}_2^{\cdot-}$ production, TBARS levels, and antioxidant enzyme activities in red crab hepatopancreas and muscle per sampling station. Main effects in ANOVA were used to analyze the first-order (non-interactive) effects of multiple categorical independent variables (station and tissue). Multiple dependent variables ($\text{O}_2^{\cdot-}$ production; TBARS levels; activity of SOD, CAT, GPx, GR, GST) were specified. The tests showed statistically significant differences ($P < 0.05$) among

xantina/xantina oxidasa, el cual reduce el nitroazul de tetrazolio a formazán, siguiendo el método descrito por Suzuki (2000). Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima que se necesita para inhibir la reacción en un 50%. Para cuantificar la actividad de CAT, se siguió espectrofotométricamente la reducción de la concentración de H_2O_2 (concentración inicial: 10 mM) durante 3.5 min (Aebi 1984). Una unidad de actividad de CAT se define como la cantidad de enzima que se necesita para reducir 1 μM de H_2O_2 por minuto. La actividad de GR se cuantificó siguiendo la disminución de absorbancia durante la oxidación de NADPH (Carlberg y Mannervik 1985, Goldberg y Spooner 1987). Una unidad de actividad de GR se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μM de NADPH por minuto. La actividad de GPx se midió según Flohé y Günzler (1984), mediante la oxidación de NADPH. Una unidad de actividad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μM de NADPH por minuto. La actividad de GST se determinó según el método de Habig y Jakoby (1981), en el cual la formación del complejo tioéter glutatión dinitrobenzeno, a partir de la conjugación del GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), se sigue espectrofotométricamente a 340 nm. Una unidad de actividad de GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la conjugación de 1 μM de CDNB por minuto a 25 °C. Los datos de la actividad de las enzimas antioxidantes se presentan como unidades mg^{-1} proteína.

Proteínas solubles

Se cuantificó la concentración de proteínas solubles para estandarizar los resultados. Para determinar tal concentración se usó un kit comercial (Bio-Rad) con albúmina sérica bovina como estándar (Bradford 1976). Los datos se presentan en mg mL^{-1} .

Análisis estadístico

Para comprobar la significancia estadística entre medias se realizaron análisis de varianza (Zar 1996). Las pruebas *post hoc* (HSD N desigual) permitieron probar la significancia estadística de diferencias específicas en ciertas partes de nuestro diseño. Asimismo, se realizó un análisis discriminante secuencial hacia adelante para determinar cuál indicador de estrés oxidativo ($\text{O}_2^{\cdot-}$, TBARS, SOD, CAT, GR, GPx, GST) proporcionaba la mejor discriminación entre los cuatro cruceros analizados (condición excluyente: músculo). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica v8.0 (StatSoft, <http://www.statsoft.com>).

RESULTADOS

La figura 1 muestra la localización de todas las estaciones de muestreo durante los cruceros realizados entre octubre y noviembre de 2004 (C1, fig. 1a) y en marzo de 2005,

sampling stations and between tissues (muscle and hepatopancreas). Hepatopancreas showed significantly higher O_2^- production, TBARS levels, and SOD, CAT, and GST activities than muscle.

Post hoc tests (unequal N HSD) were used to determine the sampling stations for each cruise in which significant differences ($P < 0.05$) for each dependent variable were found. No significant differences were found in O_2^- production in red crab muscle per sampling stations. The production of O_2^- in hepatopancreas was significantly higher ($P < 0.05$) in red crabs sampled at stations C2-6, C2-10, C3-3, and C4-23 (fig. 2a). Statistically significant ($P < 0.05$) differences in TBARS levels were also found in red crab tissues (muscle and hepatopancreas), particularly at sampling stations C2-10, C3-7, C3-18, C3-26, C3-48, C3-33, and C3-6 (fig. 2b). SOD activity was found to be significantly ($P < 0.05$) higher in muscle of red crabs collected at sampling station C2-19, and in hepatopancreas of red crabs sampled at C2-43, C2-19, and C2-10 (fig. 2c). CAT activity was significantly ($P < 0.05$) higher in muscle of red crabs collected at sampling stations C3-7 and C3-27, and in hepatopancreas of red crabs sampled at C2-32, C2-6, and C2-43 (fig. 3a). GR activity was significantly ($P < 0.05$) higher in muscle of red crabs from sampling stations C2-31, C2-8, C2-42, and C2-19 (fig. 3b). GPx activity was found to be significantly ($P < 0.05$) higher in muscle of red crabs collected at sampling stations C2-43, C2-8, and C2-19, and higher in hepatopancreas from red crabs sampled at C2-43 (fig. 3c). GST activity was higher in muscle of red crabs collected at sampling stations C2-31 and C2-19, and in hepatopancreas from red crabs collected at stations C2-16, C2-31, C2-19, C2-26, C3-18, C3-33, and C3-6 (fig. 3d). In general, antioxidant enzyme activities were higher in red crabs collected at C2 sampling stations and lower in those collected at C3 sampling stations.

Discriminant function analyses

All analyzed variables were included in the model, but only five of them (O_2^- production, TBARS levels, and activity of SOD, GPx, and GST) were significant (Wilks' lambda = 0.210; $F = 13.631$, $P < 0.000$). Table 1 shows the canonical roots (discriminant functions) and their significance. Table 2 shows the standardized coefficients for the canonical variables and, thus, the contribution to the discriminant function (root), as well as the eigenvalues (roots) for each function. The first root contributes to explaining 73.21% of the variance and the variables with highest contribution are TBARS levels and SOD activity. The second root explains 98.54% of the cumulative variance, and the activity of GPx and GST is the contributing variable. The third root explains 100% of the variance and the contributing variable is O_2^- production.

Figure 4 shows that the first discriminant function (root) separates mainly C2 and C3; the values for C3 are located to the right of the horizontal axis, with a positive mean (2.34),

noviembre de 2006 y marzo de 2007 (C2, C3, C4; fig. 1b) a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California. Las figuras 2 y 3 muestran los resultados obtenidos para la producción de O_2^- , los niveles de TBARS y la actividad de las enzimas antioxidantes en el hepatopáncreas y músculo de *P. planipes* por estación de muestreo. Se usaron los efectos principales de los análisis de varianza para analizar los efectos de primer orden (no interactivos) de las múltiples variables categóricas independientes (estación y tejido). Se especificaron las múltiples variables dependientes (producción de O_2^- ; niveles de TBARS; actividad de SOD, CAT, GPx, GR, GST). Las pruebas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las estaciones de muestreo y entre los tejidos (hepatopáncreas y músculo). La producción de O_2^- , los niveles de TBARS y la actividad de SOD, CAT y GST fueron significativamente mayores en el hepatopáncreas que en el músculo.

Las pruebas *post hoc* (HSD N desigual) permitieron determinar cuáles estaciones de muestreo de cada crucero presentaban diferencias significativas ($P < 0.05$) para cada variable dependiente. No se observaron diferencias significativas para la producción de O_2^- en el músculo de *P. planipes* por estaciones de muestreo. La producción de O_2^- en el hepatopáncreas fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en las langostillas recolectadas en las estaciones C2-6, C2-10, C3-3 y C4-23 (fig. 2a). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) para los niveles de TBARS en los tejidos (hepatopáncreas y músculo) de los individuos, especialmente en las estaciones C2-10, C3-7, C3-18, C3-26, C3-48, C3-33 y C3-6 (fig. 2b). La actividad de SOD resultó significativamente ($P < 0.05$) mayor en el músculo de las langostillas recolectadas en la estación C2-19 y en el hepatopáncreas de los individuos de C2-43, C2-19 y C2-10 (fig. 2c). La actividad de CAT fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en el músculo de las langostillas de las estaciones de muestreo C3-7 y C3-27, y en el hepatopáncreas de los individuos de C2-32, C2-6 y C2-43 (fig. 3a). La actividad de GR fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en el músculo de las langostillas de las estaciones C2-31, C2-8, C2-42 y C2-19 (fig. 3b). La actividad de GPx resultó significativamente ($P < 0.05$) mayor en el músculo de los individuos de las estaciones C2-43, C2-8 y C2-19, y mayor en el hepatopáncreas de los individuos recolectados en C2-43 (fig. 3c). La actividad de GST fue mayor en el músculo de las langostillas de las estaciones C2-31 y C2-19, y en el hepatopáncreas de los individuos de C2-16, C2-31, C2-19, C2-26, C3-18, C3-33 y C3-6 (fig. 3d). En general, la actividad de las enzimas antioxidantes fue mayor en las langostillas recolectadas en las estaciones de muestreo de C2 y menor en los ejemplares recolectados en las estaciones de muestreo de C3.

Análisis discriminante

En el modelo se incluyeron todas las variables analizadas, pero sólo cinco (producción de O_2^- , niveles de TBARS, y la

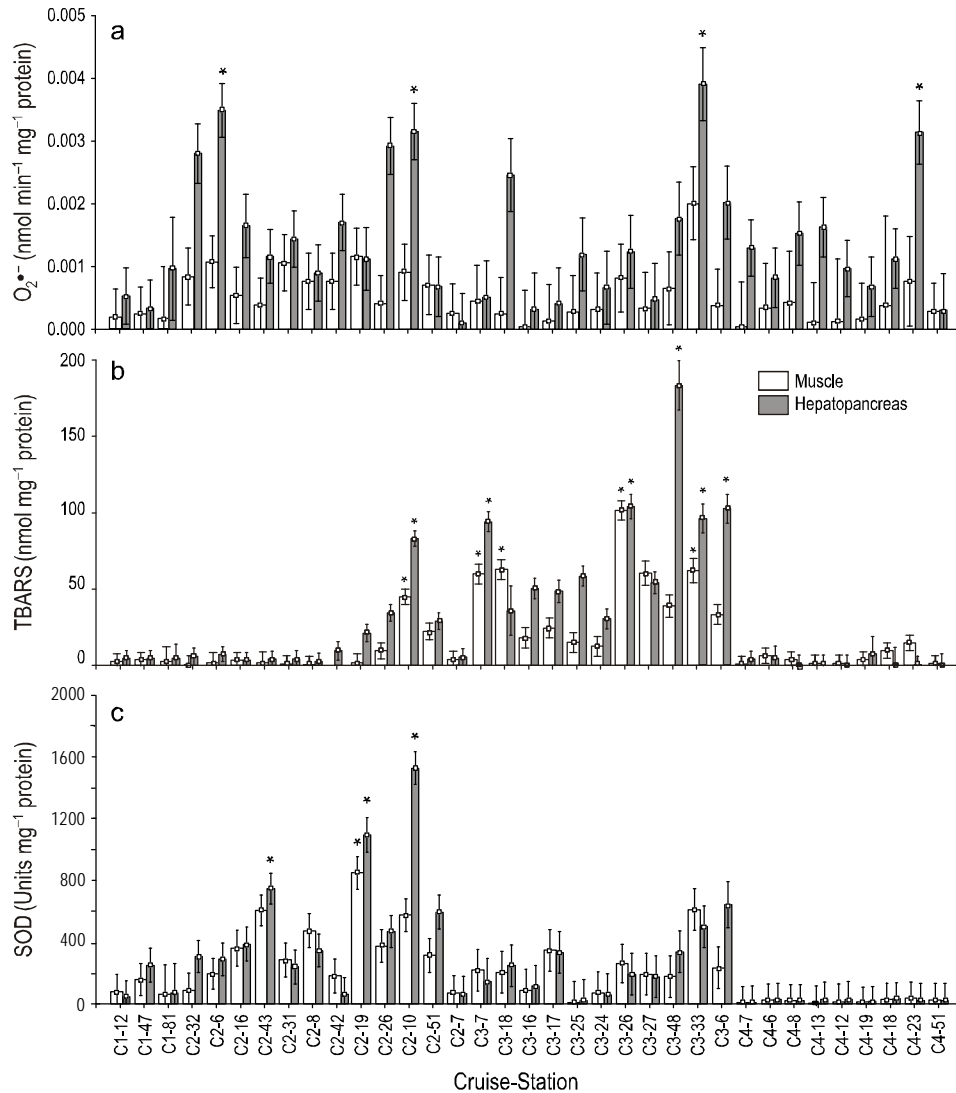


Figure 2. (a) Superoxide radical production ($O_2^{\bullet-}$), (b) lipid peroxidation (TBARS), and (c) superoxide dismutase (SOD) activity in muscle and hepatopancreas of red crab (*Pleuroncodes planipes*) collected during four research cruises along the west coast of the Baja California Peninsula. Data are shown as mean \pm standard error, $P < 0.05$.

Figura 2. (a) Producción del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), (b) peroxidación de lípidos (TBARS) y (c) actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en el hepatopáncreas y músculo de la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) recolectada durante cuatro cruceros a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California. Los datos se presentan como media \pm error estándar, $P < 0.05$.

while C2 has a negative mean (-0.94). The second function (root) distinguishes mainly between C4 and C2; values for C4 fall mainly under the central line (0) of the vertical axis with a negative mean (-1.26), and C2 with a positive mean (0.58). Therefore, it is possible to discriminate clearly and significantly between C2 and C3 with the first discriminant function and between C2 and C4 with the second discriminant function.

DISCUSSION

Oxidative stress indicators were analyzed in muscle and hepatopancreas of *P. planipes* collected during four research

actividad de SOD, GPx y GST) resultaron significativas (lambda de Wilks = 0.210; $F = 13.631$, $P < 0.000$). En la tabla 1 se muestran las raíces canónicas (funciones discriminantes) y su significancia. En la tabla 2 se presentan los coeficientes estandarizados para las variables canónicas y, por tanto, su contribución a la función discriminante (raíz), así como los eigenvalores (raíces) para cada función. La primera raíz explica 73.21% de la varianza y las variables que más contribuyen son los niveles de TBARS y la actividad de SOD. La segunda raíz explica 98.54% de la varianza y la variable que más contribuye es la actividad de GPx y GST. La tercera raíz explica 100% de la varianza y la variable que más contribuye es la producción de $O_2^{\bullet-}$.

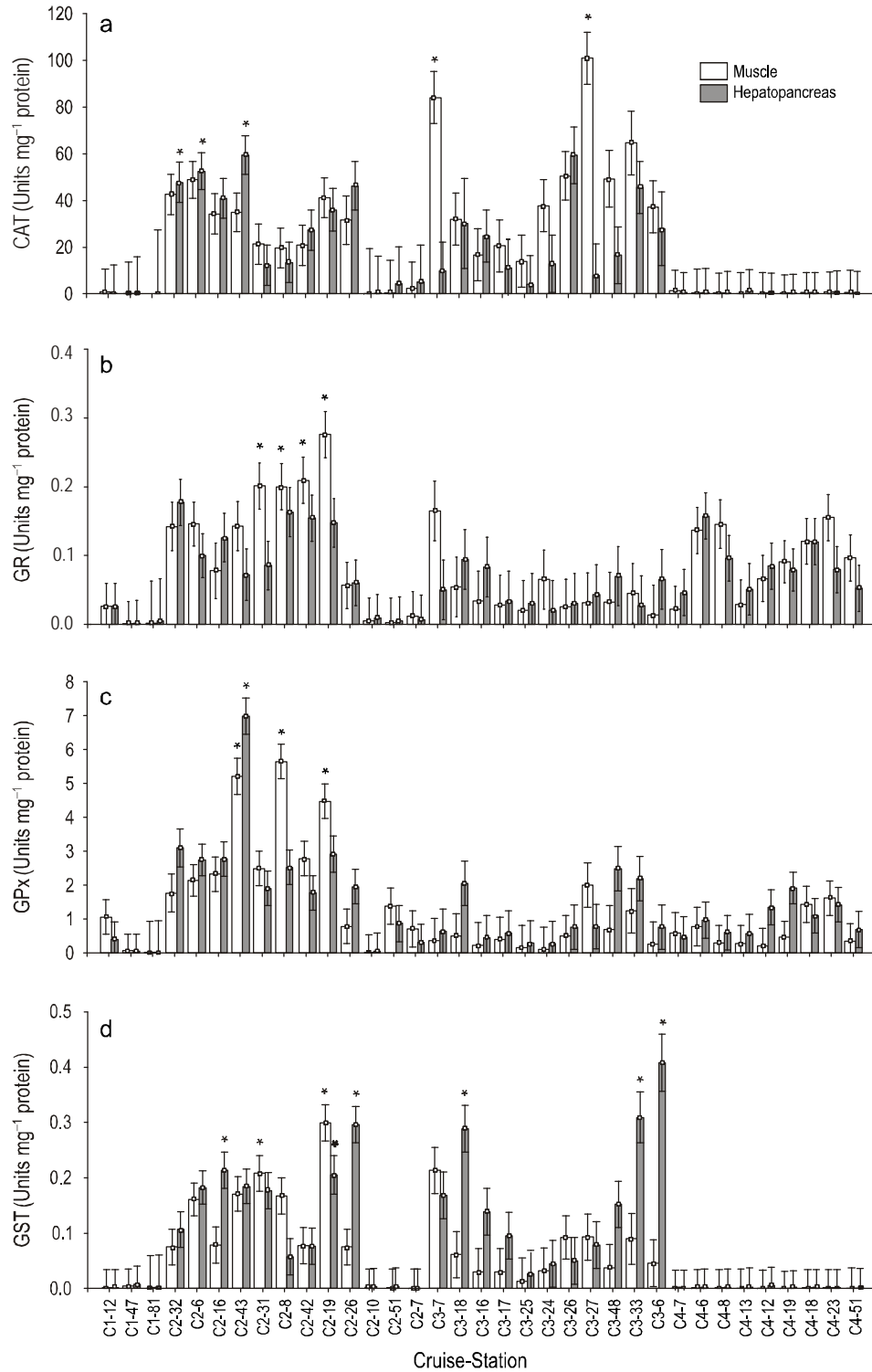


Figure 3. Activity of the antioxidant enzymes (a) catalase (CAT), (b) glutathione reductase (GR), (c) glutathione peroxidase (GPx), and (d) glutathione S-transferase (GST) in muscle and hepatopancreas of red crab (*Pleuroncodes planipes*) collected during four research cruises along the west coast of the Baja California Peninsula. Data are shown as mean \pm standard error, $P < 0.05$.

Figura 3. Actividad de las enzimas antioxidantes (a) catalasa (CAT), (b) glutatión reductasa (GR), (c) glutatión peroxidasa (GPx) y (d) glutatión S-transferasa (GST) en el músculo y hepatopáncreas de la langostilla (*Pleuroncodes planipes*) recolectada durante cuatro cruceros a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California. Los datos se presentan como media \pm error estándar, $P < 0.05$.

Table 1. Chi-square tests with successive roots removed.**Tabla 1.** Pruebas de chi cuadrado con las raíces sucesivas eliminadas.

Roots removed	Eigenvalue	Canonical R	Wilks' lambda	χ^2	d.f.	P level
0	1.818	0.803	0.210	220.67	21	0.000
1	0.629	0.621	0.592	74.08	12	0.000
2	0.036	0.187	0.965	5.04	5	0.410

cruises off the west coast of the Baja California Peninsula. Statistically significant differences were found among sampling stations and between tissues (hepatopancreas and muscle). Although hepatopancreas showed a significantly higher $O_2^{\cdot-}$ production than muscle, TBARS levels were not proportionally increased, perhaps because the antioxidant enzyme activities were statistically higher in hepatopancreas than in muscle. In both tissues, an inverse correlation (NS) was found between SOD activity and $O_2^{\cdot-}$ production. SOD dismutates $O_2^{\cdot-}$ into the less reactive H_2O_2 , thereby contributing to prevention of oxidative damage (Halliwell and Gutteridge 2001). Arun and Subramanian (1998) reported higher antioxidant enzyme activities in hepatopancreas than in muscle of subadult freshwater prawn *Macrobrachium malcomsonii*. Hepatopancreas is the site of multiple oxidative reactions and may, therefore, be the site of highest ROS production (Arun and Subramanian 1998). Similar differences among tissues were found in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Zenteno-Savín *et al.* 2006). The hepatopancreas has multiple functions, including detoxification, metabolism of digested products, secretion of digestive

Table 2. Standardized coefficients of the canonical variables. An asterisk denotes the variables that contribute most importantly to each root.**Tabla 2.** Coeficientes estandarizados de las variables canónicas. El asterisco indica las variables que más contribuyeron a cada raíz.

Variable	Root 1	Root 2	Root 3
$O_2^{\cdot-}$	-0.269	-0.264	0.640*
TBARS	1.062*	0.364	0.229
SOD	-0.618*	0.351	-0.500
CAT	-0.019	0.288*	-0.124
GR	-0.177	0.140	0.390*
GPx	-0.191	0.452*	0.358
GST	-0.020	0.463*	-0.146
Eigenvalue	1.818	0.629	0.036
Cumulative proportion	0.732	0.985	1.000

$O_2^{\cdot-}$ = superoxide radical; TBARS = thiobarbituric acid-reactive substances; SOD = total superoxide dismutase; CAT = catalase; GR = glutathione reductase; GPx = glutathione peroxidase; GST = glutathione S-transferase.

En la figura 4 se observa que la primera función discriminante (raíz) principalmente separa C2 y C3; los valores de C3 se localizan a la derecha del eje horizontal, con una media positiva (2.34), mientras que C2 tiene una media negativa (-0.94). La segunda función discriminante (raíz) principalmente distingue entre C4 y C2; los valores de C4 están mayormente por debajo de la línea central (0), con una media negativa (-1.26), mientras que C2 tiene una media positiva (0.58). Por ende, es posible discriminar claramente y significativamente entre C2 y C3 con la primera función discriminante y entre C2 y C4 con la segunda función discriminante.

DISCUSIÓN

Se analizaron los indicadores de estrés oxidativo en el hepatopáncreas y músculo de *P. planipes* recolectada durante cuatro cruceros a lo largo de la costa occidental de la península de Baja California. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las estaciones de muestreo y entre los tejidos (hepatopáncreas y músculo). Aunque el hepatopáncreas presentó una producción de $O_2^{\cdot-}$ significativamente mayor que el músculo, los niveles de TBARS no incrementaron proporcionalmente, posiblemente porque la actividad de las enzimas antioxidantes fue significativamente mayor en el hepatopáncreas que en el músculo. En ambos tejidos se observó una correlación inversa (NS) entre la actividad de SOD y la producción de $O_2^{\cdot-}$. La SOD provoca la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , que es menos reactivo, contribuyendo de esta forma a la prevención de daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge 2001). Arun y Subramanian (1998) observaron mayor actividad de las enzimas antioxidantes en el hepatopáncreas de subadultos del camarón de agua dulce *Macrobrachium malcomsonii*. El hepatopáncreas es donde suceden múltiples reacciones oxidativas y, por tanto, podría ser el sitio de mayor producción de ERO (Arun y Subramanian 1998). Se documentaron diferencias similares para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Zenteno-Savín *et al.* 2006). Las funciones del hepatopáncreas son varias, incluyendo detoxificar, metabolizar productos digeridos, secretar enzimas digestivas, absorber y almacenar reservas minerales (Gibson y Barker 1979), así como mantener el equilibrio electrolítico (Gamble *et al.* 1995).

Se observó una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$ en las langostillas recolectadas en las estaciones de muestreo de C2; sin

enzymes, absorption, and storage of mineral reserves (Gibson and Barker 1979), as well as maintaining the electrolyte balance (Gamble *et al.* 1995).

Higher O_2^- production was found among red crabs collected at the C2 sampling stations; however, elevated TBARS levels were only found at C2-10. This suggests that the activities of the antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GR, and GST) in the red crabs collected in the spring of 2005 were sufficient to avoid oxidative damage. In contrast, red crabs collected during C3 had elevated TBARS levels and relatively lower levels of antioxidant enzymes, suggesting an oxidative stress process in red crabs during the autumn of 2006. Decreased antioxidant levels are commonly found under food restriction conditions (Gomi and Matsuo 1998, Bayir *et al.* 2011). Elevated TBARS levels in the absence of increased O_2^- production may be due to an increase in other ROS not quantified in this study, such as H_2O_2 .

In general, the red crabs collected at the C2 sampling stations had higher O_2^- production and antioxidant enzyme activities than those collected during C3. Furthermore, the first root of the discriminant analysis allowed distinguishing between C2 and C3; the variables with the highest contribution to the variance were TBARS levels and SOD activity. It is possible that there is an antioxidant enzyme response in red crabs to the prevailing environmental conditions on the west coast of the Baja California Peninsula. C1 was conducted in autumn 2004, considered an El Niño year, lasting from JJA 2004 to DJF 2005 based on a threshold of ± 0.5 °C for the Oceanic Niño Index (ONI) (three-month running mean of ERSST.v3b SST anomalies in the Niño 3.4 region (5N–5S, 120–170W)) (http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml). A satellite image of the mean sea surface temperature in the study area (De Anda-Montañez *et al.* 2007) shows that autumn 2004 had near average temperatures, with positive anomalies, that is, with a warm tendency. Under these environmental conditions, the distribution and abundance of red crabs were low; in fact, *P. planipes* was only found at 4 of the 39 sampling stations. C2 was conducted in spring 2005, declared a neutral year (above website), and red crabs were highly abundant and widely distributed under the prevailing environmental conditions (De Anda-Montañez *et al.* 2007). C3 was conducted during autumn 2006, declared an El Niño year, lasting from ASO 2006 to DJF 2007 (above website). Under these El Niño conditions, red crab abundance decreased significantly with respect to C2, and distribution was restricted to the deepest stations of each transect (De Anda-Montañez *et al.* 2007). Increased temperatures alter the metabolic rate and, thus, ROS production in crustaceans (Fanjul-Moles and Gonsebatt 2012). Temperature modulates antioxidant enzyme activities in worm, limpet, clam, mussel, and fish (Abele *et al.* 1998a, 1998b, 2002; Wilhelm-Filho *et al.* 2001a, 2001b). In spring 2007, when C4 was conducted, sea surface temperatures were close to the average (De Anda-Montañez *et al.* 2007). Although environmental conditions during C4 were

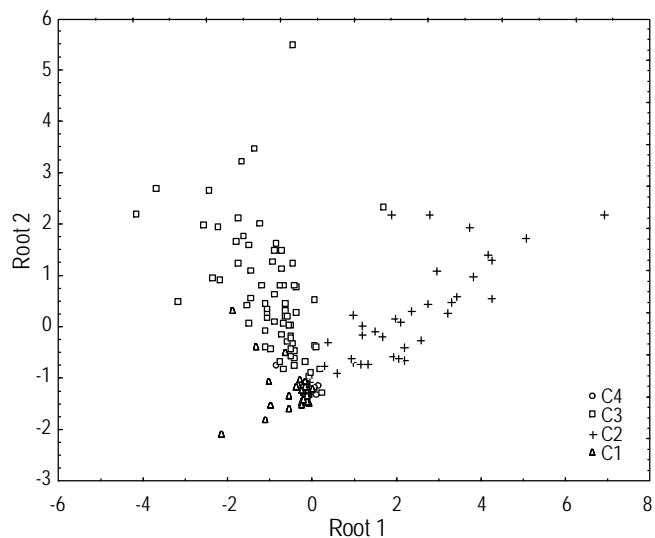


Figure 4. Scatterplot of canonical scores for pairs of discriminant functions (canonical roots) between cruises.

Figura 4. Diagrama de los puntajes canónicos para pares de funciones discriminantes (raíces canónicas) entre cruceros.

embargo, sólo se encontraron niveles elevados de TBARS en C2-10. Esto sugiere que la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR y GST) en los individuos recolectados en la primavera de 2005 fue suficiente para evitar daño oxidativo. En contraste, las langostillas recolectadas durante C3 presentaron niveles altos de TBARS y niveles relativamente menores de las enzimas antioxidantes, lo que sugiere un proceso de estrés oxidativo en los individuos recolectados en el otoño de 2006. Es común encontrar menores niveles de antioxidantes cuando hay restricción de alimento (Gomi y Matsuo 1998, Bayir *et al.* 2011). Los niveles elevados de TBARS en ausencia de mayor producción de O_2^- pueden deberse a un incremento en otras ERO no cuantificadas en este estudio, como H_2O_2 .

En general, las langostillas recolectadas en las estaciones de muestreo de C2 presentaron una mayor producción de O_2^- y actividad de enzimas antioxidantes que los individuos recolectados durante C3. Además, la primera raíz del análisis discriminante permitió distinguir entre C2 y C3; las variables que más contribuyeron a la varianza fueron los niveles de TBARS y la actividad de SOD. Es posible que exista una respuesta de las enzimas antioxidantes en las langostillas a las condiciones ambientales prevalecientes en la costa oeste de la península de Baja California. C1 se llevó a cabo en el otoño de 2004, considerado un año El Niño, que duró de junio de 2004 a febrero de 2005 con base en un umbral de ± 0.5 °C para el Índice Oceánico de El Niño (ONI por sus siglas en inglés) (media móvil de tres meses de las anomalías de la temperatura superficial del mar de ERSST.v3b en la región Niño 3.4 (5N–5S, 120–170W)) (http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/ensostuff/ensoyears.shtml). Una imagen satelital de la temperatura superficial del

neutral, red crabs were as scarce as in El Niño years (C1 and C3). This may be due to biological resources not having fully recovered after the El Niño conditions that lasted five months and ended in DJF 2007 (above website).

In summary, significant differences were found between tissues and among sampling stations. Although hepatopancreas showed a significantly higher O_2^- production than muscle, TBARS levels were not proportionally increased, perhaps because the antioxidant enzyme activities were statistically higher in hepatopancreas than in muscle. Red crabs collected at the C2 sampling stations had higher, while those collected during C3 had lower O_2^- production and antioxidant enzyme activities. The coldest sea surface temperatures for the period 2004–2007 were recorded during C2. C3 (autumn 2006) coincided with El Niño environmental conditions; red crabs were restricted to the deeper stations and, although O_2^- production appeared to be low, antioxidant enzyme activities were also low, suggesting that red crabs are more susceptible to oxidative damage during warm El Niño conditions. Potential effects of the changes in sea temperature associated with global climate change on the oxidative stress indicators in red crab tissues and the potential consequences for their populations need to be addressed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the authorities of the Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the funding of project No. 19. Thanks are also due to the crew of *BIP XII* for their collaboration during the cruises, particularly captain Gabriel Rivera Velázquez, and Orlando Lugo-Lugo for assistance in sample processing at the Laboratorio de Salud Ambiental y Biomedicina (CIBNOR). Comments and suggestions from two anonymous reviewers and the editor helped to improve the manuscript.

REFERENCES

- Abele D, Großpietsch H, Pörtner HO. 1998a. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO_2 , temperature, H_2O_2 and H_2S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 163: 179–191.
- Abele D, Burlando B, Viarengo A, Pörtner HO. 1998b. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120: 425–435. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10028-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10028-7)
- Abele D, Heise K, Pörtner HO, Puntarulo S. 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.* 205: 1831–1841.
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. In: Packer L (ed.), *Methods in Enzymology*. Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Boston, Massachusetts, pp. 121–126.
- mar promedio en el área de estudio (De Anda-Montañez *et al.* 2007) muestra que durante el otoño de 2004 las temperaturas estuvieron cerca del promedio, con anomalías positivas, esto es, más calurosas. Cuando se presentaron estas condiciones ambientales, la distribución y abundancia de *P. planipes* fue baja; de hecho, sólo se encontraron individuos en 4 de las 39 estaciones de muestreo. C2 se llevó a cabo en la primavera de 2005, considerado un año neutral (sitio Web citado arriba), y en las condiciones ambientales prevalencientes, se encontró una gran abundancia y amplia distribución de *P. planipes* (De Anda-Montañez *et al.* 2007). C3 se realizó en el otoño de 2006, declarado un año El Niño, que duró de agosto de 2006 a febrero de 2007 (sitio Web citado arriba). En estas condiciones de El Niño, la abundancia de *P. planipes* disminuyó significativamente en relación con C2, y la distribución se restringió a las estaciones más profundas de cada transecto (De Anda-Montañez *et al.* 2007). Temperaturas elevadas alteran la tasa metabólica y, por ende, la producción de ERO en los crustáceos (Fanjul-Moles y Gonsebatt 2012). La temperatura regula la actividad de las enzimas antioxidantes en gusanos, lapas, almejas, mejillones y peces (Abele *et al.* 1998a, 1998b, 2002; Wilhelm-Filho *et al.* 2001a, 2001b). En la primavera de 2007, cuando se llevó a cabo C4, las temperaturas superficiales del mar estuvieron cerca del promedio (De Anda-Montañez *et al.* 2007). A pesar de que las condiciones ambientales durante C4 fueron neutrales, las langostillas estuvieron igual de escasas que durante los años El Niño (C1 y C3). Esto se podría deber a que los recursos biológicos no se habían recuperado completamente después de las condiciones de El Niño que duraron cinco meses, acabando en febrero de 2007 (sitio Web citado arriba).
- En resumen, se encontraron diferencias significativas entre los tejidos y entre las estaciones de muestreo. Aunque la producción de O_2^- fue significativamente mayor en el hepatopáncreas que en el músculo, los niveles de TBARS no incrementaron proporcionalmente, posiblemente porque la actividad de las enzimas antioxidantes fue estadísticamente mayor en el hepatopáncreas que en el músculo. Las langostillas recolectadas en las estaciones de muestreo de C2 y C3 presentaron una mayor y menor, respectivamente, producción de O_2^- y actividad de las enzimas antioxidantes. Las menores temperaturas superficiales del mar para el periodo de 2004 a 2007 se registraron durante C2. C3 (otoño de 2006) coincidió con condiciones ambientales de El Niño; durante este crucero las langostillas se restringieron a las estaciones más profundas y, aunque la producción de O_2^- parecía baja, la actividad de las enzimas antioxidantes también fue baja, lo que sugiere que *P. planipes* es más susceptible a daño oxidativo durante condiciones cálidas de El Niño. Es necesario estudiar los efectos potenciales de los cambios en la temperatura del mar asociados al cambio climático global en los indicadores de estrés oxidativo en los tejidos de *P. planipes*, así como las consecuencias potenciales para sus poblaciones.

Alessio H, Hagerman A. 2006. Oxidative Stress, Exercise and Aging. Imperial College Press, London, 184 pp.

Arun S, Subramanian P. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol.* 121: 273–277. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10100-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10100-1)

Aurióles-Gamboa D, Balart EF (eds.). 1995. La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México, 233 pp.

Aurióles-Gamboa D, Balart EF, Castro-Aguirre JL. 1995. Recomendaciones para la explotación y aprovechamiento de la langostilla. In: Aurióles-Gamboa D, Balart EF (eds.), La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México, pp. 221–233.

Bayir A, Sirkecioglu AN, Bayir M, Haliloglu HI, Kocaman EM, Aras NM. 2011. Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. *Comp. Biochem. Physiol.* 159(4): 191–196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.04.008>

Bazzino G, Gilly WF, Markaida U, Salinas-Zavala CA, Ramos-Castillejos J. 2010. Horizontal movements, vertical-habitat utilization and diet of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Pacific Ocean off Baja California Sur, Mexico. *Prog. Oceanogr.* 86: 59–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pocean.2010.04.017>

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302–310.

Carlberg I, Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113: 484–490.

Castro-González MI, Carrillo-Domínguez S, Pérez-Gil Romo F, Calvo-Carrillo C. 1995. Composición química de la langostilla y procesos tecnológicos. In: Aurióles-Gamboa D, Balart EF (eds.), La Langostilla: Biología, Ecología y Aprovechamiento. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, México, pp. 163–177.

De Anda Montañez JA, Balart EF, Pérez-Enriquez R, Zenteno-Savín T, Méndez-Rodríguez LC, Amador-Buenrostro A, Rodríguez-Jaramillo C, Olguín-Espinoza I, Galindo-Cortes G, Hernández-Martínez F, Rodríguez-Romero J. 2007. Estimación de parámetros poblacionales y evaluación de biomasa de crustáceos galateidos (*Pleuroncodes planipes* y *Munida* spp.) en la costa occidental de la Península de Baja California. La Paz, Baja California Sur, México. SAGARPA-CONACyT No 19, CIBNOR, Informe Final de Investigación, 152 pp.

Drossos G, Lazou A, Panagopoulos P, Westaby S. 1995. Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium. *Ann. Thoracic Surgery* 59: 169–172. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975\(94\)00726-N](http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975(94)00726-N)

Fanjul-Moles ML, Gonsébat ME. 2012. Oxidative stress and antioxidant systems in crustacean life cycles. In: Abele D, Vázquez-Medina JP, Zenteno-Savín T (eds.), Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. 1st ed. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 208–223.

Flohé L, Günzler WA. 1984. Assays for glutathione peroxidase. In: Packer L (ed.), *Methods in Enzymology*. Vol. 105: Oxygen radicals in biological systems. Academic Press, Boston, Massachusetts, pp. 114–120.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las autoridades de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) su apoyo al proyecto No. 19. También se agradece la tripulación del *BIP XII* su colaboración durante los cruceros, en especial el capitán Gabriel Rivera Velázquez, y a Orlando Lugo-Lugo su asistencia en el procesamiento de las muestras en el Laboratorio de Salud Ambiental y Biomedicina (CIBNOR). Los comentarios y sugerencias de dos revisores anónimos y el editor contribuyeron a mejorar el manuscrito.

Traducido al español por Christine Harris.

Freire CA, Welker AF, Storey JM, Storey KB, Hermes-Lima M. 2012. Oxidative stress in estuarine and intertidal environments (temperate and tropical). In: Abele D, Vázquez-Medina JP, Zenteno-Savín T (eds.), Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. 1st ed. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 41–57.

Gamble SC, Goldfarb PS, Porte C, Livingstone DR. 1995. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). *Mar. Environ. Res.* 39: 191–195. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)00031-J](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(94)00031-J)

Gibson R, Barker PL. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17: 285–346.

Goldberg DM, Spooner RJ. 1987. Glutathione reductase. In: Bergmeyer HU (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol III. Enzymes, I: Oxidoreductases, transferases. Verlag Chemie, Frankfurt, pp. 258–265.

Gomi F, Matsuo M. 1998. Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers. *J. Gerontol.* 53(3): 161–167.

Habig WH, Jakoby HB. 1981. Glutathione S-transferases (rat and human) In: Jakoby WB (ed.), *Methods in Enzymology*. Vol. 77. Academic Press, Boston, Massachusetts, pp. 218–235.

Halliwell B, Gutteridge JM. 2001. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.

Heise K, Puntarulo S, Pörtner HO, Abele D. 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 134: 79–90. [http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00212-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00212-0)

Hermes-Lima M, Storey KB. 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268: 1386–1393.

Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.* 120: 437–448.

Hernández-Llamas A, Balart EF, Ponce-Díaz G, Civera-Cerecedo R. 2006. Feasibility of a new fishery in Baja California, Mexico based on the red crab *Pleuroncodes planipes*: Preliminary economic evaluation and risk assessment. *Aquat. Living Resour.* 19: 173–179.

Martínez-Cayuela M. 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharm.* 39: 5–18.

- Ríos de Molina M. 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*. Vol. 2, número 1. Argentina, ISSN 1666-7948 (online version), pp. 1-13.
- Robinson CJ, Gómez-Aguirre S. 2004. Tidal stream used by the red crab *Pleuroncodes planipes* in Bahía Magdalena, Mexico. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308(2): 237-252.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82: 291-295.
- Suzuki K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. In: Taniguchi N, Gutteridge J (eds.), *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press, New York, pp. 91-95.
- Vega-Villasante F, Nolasco H, Fallaerero A, Carrillo-Farnes O. 2002. Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatheidae) as potential feed additive, considerations for a new fishery along the Mexico Pacific coast. *Hidrobiologica* 12(2): 119-128.
- Wehrtmann IS, Herrera-Correal J, Vargas R, Hernández P. 2010. Squat lobsters (Decapoda: Anomura: Galatheidae) from deepwater Pacific Costa Rica: Species diversity, spatial and bathymetric distribution. *Nauplius* 18(1): 69-77.
- Wilhelm-Filho D, Torres MA, Tribess TB, Pedrosa RC, Soares CHL. 2001a. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34: 719-726. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2001000600004>
- Wilhelm-Filho D, Tribess T, Gáspari C, Cláudio FD, Torres MA, Magalhães ARM. 2001b. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203: 149-158. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00599-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00599-3)
- Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, 662 pp.
- Zenteno-Savín T. 2002. Oxidative stress in marine organisms. In: Johnson P, Boldyrev AA (eds.), *Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Level*. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 67-76.
- Zenteno-Savín T, Saldierna R, Ahuejote-Sandoval M. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 142: 301-308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.001>

*Received May 2012,
received in revised form November 2012,
accepted November 2012.*