



Universidad Austral de Chile

Escuela de Acuicultura y Pesquerías

**Fisiología respiratoria del camarón fantasma**  
***Neotrypaea uncinata* (Milne Edwards, 1837) (Decapoda: Thalassinidea) durante la**  
**hipoxia y reoxigenación**

Tesis para optar al Título de Ingeniero  
en Acuicultura

Profesor Patrocinante: Dr. Kurt Paschke  
Instituto de Acuicultura

FÉLIX PATRICIO LEIVA LEIVA

PUERTO MONTT- CHILE

2011

*“A key hazard in our field is the risk of stamp collecting: wanting to repeat on yet another novel organism what has already been done on other species. Sometimes this is justified; sometimes not. It seems to be a judgment call, but one always rife with hazard”*

*“Rather than engage in work on sure-things—the “collection of stamps”— we were challenged to do something new, even if it meant taking some intellectual risks in the process”*

*P.W. Hochachka*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ditnarda y Félix, mis maestros de la vida, que con amor y sobretodo, esfuerzo, lograron cumplir mi anhelo de estudiar en la Universidad.

A todos mis hermanos, quienes a pesar de la lejanía, siempre estuvieron conmigo en esta importante etapa, en especial a mi hermano “Beto” por *darme trabajo* como “pescador artesanal” y de cierta forma, contribuir al financiamiento de mis años de estudio en la Universidad. A mis hermanas Blanca y Bárbara, por brindarme un hogar y hacerme sentir la agradable sensación de estar en familia.

A Cecilia, por su valiosa compañía durante el tiempo que hemos estado juntos y por incentivar me diariamente en el término de este trabajo.

A mi profesor patrocinante, el Dr. Kurt Paschke, quien hizo que este trabajo fuera posible. Gracias *profe* por darme la libertad de llevar a cabo mis ideas.

A mis profesores informantes, la Dra. Paulina Gebauer y al Dr. Oscar Chaparro, quienes aportaron de gran manera con sus comentarios en la revisión temprana de esta tesis.

A Juan Pablo, el “*capo*” del LECOFIC, quien, en desmedro de su tiempo, nunca dejó de ayudarme en los experimentos y análisis de las muestras.

A los viejos amigos y mala junta de siempre (“*pero en buena*”): Perrin, Sherdo, Oscar, Julio, Jona, JP, Pollo, Petercio y a todo aquel que me resulto de ayuda.

Al proyecto FONDECYT 1110637 por el financiamiento de este trabajo.

A todos ellos... gracias

## INDICE

AGRADECIMIENTOS	I
INDICE	II
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1 Hipótesis	4
1.2 Objetivos	5
1.2.1 General	5
1.2.2 Específicos	5
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>6</b>
2.1 Animales Experimentales y Mantenimiento	6
2.2 Diseño experimental	8
2.3 Consumo de oxígeno	10
2.4 Muestreo y Análisis de Hemolinfa	11
2.5 Análisis de los datos	12
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>13</b>
3.1 Respuesta fisiológica de <i>N. uncinata</i> a distintas $PO_2$	13
3.1.1 Consumo de oxígeno	13
3.1.2 Concentración de oxihemocianina [Hc]	14
3.1.3 Proteínas en hemolinfa	15

3.2 Respuesta fisiológica de <i>N. uncinata</i> a la hipoxia aguda y reoxigenación	16
3.2.1 Consumo de oxígeno	16
3.2.2 Concentración de oxihemocianina [Hc]	17
3.2.3 Proteínas en hemolinfa	19
3.2.4 Lactato Deshidrogenasa en hemolinfa (LDH)	21
<b>4. DISCUSION</b>	<b>22</b>
4.1 Respuesta fisiológica de <i>N. uncinata</i> a distintas $PO_2$	22
4.2 Respuesta fisiológica de <i>N. uncinata</i> a la hipoxia aguda y reoxigenación	25
<b>5. CONCLUSION</b>	<b>28</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>29</b>

## INDICE DE FIGURAS

- Figura.1. *N. uncinata*. Zona de colección del camarón fantasma en el intermareal en la localidad de Puntilla Tenglo, Puerto Montt, Chile. 6
- Figura 2. *N. uncinata*. Relación del peso húmedo y peso seco con el largo del cefalotórax (CL) en camarones fantasmas (n=22). 8
- Figura 3. *N. uncinata*. Esquema del diseño experimental para estudiar (A) el efecto de distintos niveles de oxígeno y (B) de la hipoxia aguda y reoxigenación sobre el consumo de oxígeno y diversas variables fisiológicas cuantificadas en la hemolinfa (concentración de hemocianina, proteínas totales y actividad específica de la lactato deshidrogenasa). 9
- Figura 4. *N. uncinata*. Consumo de oxígeno de camarones expuestos a diferentes niveles de oxígeno. Los valores son presentados como promedios ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr peso seco}^{-1}$ )  $\pm$  desviación estándar de 6 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ). 13
- Figura 5. *N. uncinata*. Concentración de oxihemocianina de camarones expuestos a diferentes niveles de oxígeno. Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 6 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ). 14

Figura 6. *N. uncinata*. Proteínas en hemolinfa de camarones expuestos a diferentes niveles de oxígeno. Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 6 animales por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ). 15

Figura 7. *N. uncinata*. Consumo de oxígeno de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C: control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia+12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia+6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia+12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr peso seco}^{-1}$ )  $\pm$  desviación estándar de 8 animales por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ) 16

Figura 8. *N. uncinata*. Concentración de oxihemocianina de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C: control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia+6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia +12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia + 12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 8 animales por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ) 18

Figura 9. *N. uncinata*. Proteínas en la hemolinfa de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C: control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia + 12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia+12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de un  $n=5$ . Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P<0,05$ ). 20

Figura 10. *N. uncinata*. Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C: control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia +12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia +12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 5 animales por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P<0,05$ ). 21

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>N. uncinata</i> . Valores de la presión crítica de oxígeno ( $P_{CO_2}$ ) para el consumo de oxígeno dentro de diversas especies de crustáceos decápodos.	24
---	----

## RESUMEN

Por la influencia del ciclo mareal, los ambientes intermareales están caracterizados por fluctuaciones periódicas en varios parámetros ambientales, entre ellos, el oxígeno, el cual bajo ciertas condiciones, puede alcanzar valores extremos. A pesar de esto, numerosos invertebrados habitan allí. Los talasínidos, son un Infraorden de decápodos caracterizados por construir madrigueras, donde la disponibilidad de oxígeno es limitada durante la marea baja. En este estudio, el consumo de oxígeno, oxihemocianina, proteínas totales en la hemolinfa y actividad de la lactato deshidrogenasa fueron determinadas en el camarón fantasma *Neotrypaea uncinata* a distintos niveles de oxígeno, en hipoxia aguda y durante la reoxigenación. A diferentes niveles de oxígeno, una regulación en los consumos de oxígeno fue observada hasta un rango de 4-9 kPa, mientras que un aumento tanto en la concentración de hemocianina como en las proteínas hemolinfáticas ocurrió a  $PO_2 < 4$  kPa. Aunque un efecto de la hipoxia y reoxigenación en la actividad específica de la lactato deshidrogenasa no se observó, el consumo de oxígeno y la concentración de hemocianina de los camarones muestran valores similares a los controles en las 12-hr de recuperación. Se postula que la regulación del consumo de oxígeno y el aumento de la concentración de oxihemocianina durante la hipoxia son respuestas fisiológicas para contrarrestar la deficiencia de oxígeno producida durante la baja marea, que permitirían a *N. uncinata* hacer frente a condiciones de hipoxia. La información obtenida en este estudio no sólo es importante para el entendimiento de los mecanismos fisiológicos que muestra *N. uncinata* ante bajas de oxígeno, sino que además entrega información relevante para un escenario de cambiantes condiciones en el ambiente marino.

## ABSTRACT

Due to the influence of tidal cycle, intertidal environment are characterized by periodic fluctuations in various environmental parameters, including oxygen, which under certain conditions can achieve extreme values. Despite this, many invertebrates live there. Thalasinids ghost shrimps is a particular decapod Infraorder characterized by burrowing habits in mudflats, where the oxygen availability is limited during low tide. In this study, oxygen consumption, oxyhemocyanin, hemolymph protein and specific activity of lactate dehydrogenase were determined in the ghost shrimp *Neotrypaea uncinata*, at different oxygen levels, in acute hypoxia and during reoxygenation. All physiological parameters were modulated by hypoxia exposure. At different oxygen level, the oxygen consumption was independent until 4-9 kPa, while an increase in both hemocyanin and blood proteins at  $PO_2 < 4$  kPa occurred. Although an effect of hypoxia and reoxygenation on specific activity of lactate dehydrogenase was not observed, at 12-hr recovery, oxygen consumption and hemocyanin showed values similar to controls. Oxy-regulation and increased of oxyhemocyanin concentration during hypoxia are postulated as physiological responses to cope oxygen deficiency produced during low tide, which would allow *N. uncinata* to cope with hypoxic conditions. The information obtained in this study is not only important for understanding the physiological mechanisms exhibited by *N. uncinata* during hypoxia, but also provides information relevant to a scenario of changing conditions in the marine environment.

## 1. INTRODUCCION

Como medio respiratorio, el aire contiene cerca de 30 veces más oxígeno por litro que el agua, y esta tiene un coeficiente de difusión para el oxígeno de 8000 veces menor (Schmidt-Nielsen, 1997). Ésta propiedad física que caracteriza a ambos ambientes, ha generado que tanto respiradores acuáticos como aéreos exhiban diferencias en las respuestas a niveles de oxígeno ambiental y sean por lo tanto, comparados separadamente (Hochachka & Somero, 2002). Con excepción de ciertas áreas geográficas (Himalayas, Alpes, Andes, etc.), es difícil encontrar áreas hipóxicas en el medio aéreo (Hochachka *et al.*, 2002; Novoa *et al.*, 2003), no así en el medio acuático, donde tanto la severidad como duración son altas (Childress & Seibel, 1998). Si bien es cierto, esta afirmación es válida para las zonas mínimas de oxígeno (OMZ, Oxygen Minimum Zones), existen otros ambientes acuáticos donde fluctuaciones periódicas en la disponibilidad de este parámetro ocurren. En hábitats costeros, específicamente en la zona marina intermareal, los organismos que allí habitan están expuestos a diversos estresores de tipo físicos que incluyen salinidad, desecación, exposición aérea, entre otros, debido en gran parte al ciclo mareal (Nybakken, 2000; Stillman, 2002; Willmer *et al.*, 2005). Ejemplos clásicos de tal condición son los sedimentos y pozas intermareales, donde la saturación de oxígeno puede alcanzar rangos extremos que van desde 0% en la noche a 400% durante el día (Truchot & Douhamel-Jouve, 1980; Richards, 2011). Más aún, se ha descrito que el oxígeno puede penetrar tan solo pocos centímetros en el sedimento (Ziebis *et al.*, 1996), lo que torna más difícil la condición para los organismos que allí habitan. Sin embargo, y a pesar de esta condición, existen diversos taxa que se desempeñan en estos ambientes (Denny &

Gaines, 2007). Un particular grupo de crustáceos, los talasínidos, cuya principal característica es la construcción de madrigueras en sustratos arenosos o fangosos, están dentro de los más comunes en este tipo de ambientes.

En el sur de Chile, *Neotrypaea uncinata* (anteriormente *Callianassa uncinata*), es común habitante en marismas desde el Sur de México hasta la Península de Taitao, Chile (Thatje, 2003). Al igual que todos los miembros de su grupo, presenta un estilo de vida críptica, caracterizado por la construcción de madrigueras en sustratos blandos, y posiblemente, con cierto grado de hipoxia. De hecho, estimaciones en terreno concierne al contenido de oxígeno en las madrigueras de otros talasínidos dan cuenta que eventos de hipoxia son frecuentes y característicos dentro del grupo (Atkinson & Taylor, 1988; 2005). Claros ejemplos de especies que viven en tales condiciones son *Lepidophthalmus louisianensis* (anteriormente, *Callianassa jamaicense*) y *Callianassa subterranea*, en cuyas madrigueras, durante el periodo de marea baja, se registran valores en la presión parcial de oxígeno de hasta 0.06 kPa ( $\approx 0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) y 0 kPa (anoxia), respectivamente (Congleton, 1974; Felder, 1979). Dentro de los talasínidos, mecanismos para contrarrestar tal condición, están dados por la exhibición de diferentes respuestas adaptativas, tanto a nivel de comportamiento, fisiología y metabolismo. Es así como numerosos trabajos enfocados en describir tales aspectos han sido realizados. Comportamientos de irrigación y ventilación de la madriguera durante la marea baja (Farley & Case, 1968; Torres *et al.*, 1977; Mukai & Koike, 1984; Stamhuis & Videler, 1998 a,b,c; Hagerman, 1998), regulación de las tasas metabólicas por sobre amplios niveles de oxígeno (Thompson & Pritchard, 1969; Felder, 1979; Pritchard & Eddy, 1979; Hill, 1981; Zebe, 1982; Anderson *et al.*, 1994; Paterson &

Thorne, 1995; Astall *et al.*, 1997; Bourgeois & Felder, 2001; Holman, 2006; Holman & Hand, 2009) y alta afinidad de la hemocianina por el oxígeno (Miller & Van Holde, 1974; Roxby *et al.*, 1974; Miller *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1977; Miller & Van Holde, 1981; Taylor *et al.*, 2000; Paoli *et al.*, 2007) son las principales adaptaciones de estos crustáceos para vivir en estos ambientes.

Aunque la habilidad de sobrevivir por extensos periodos de hipoxia crónica o anoxia es una característica en común de gran parte de los invertebrados marinos que habitan la zona intermareal (ver revisiones, Herreid, 1980; DeFur, 1988; McMahon, 1988; Grieshaber *et al.*, 1994; Burnett & Stickle, 2001), recientes estudios demuestran que los crustáceos, comparados con moluscos y poliquetos, son el grupo de invertebrados más sensibles a la hipoxia (Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008; 2010). En consecuencia, y dado el incremento en la frecuencia, duración y severidad de las deficiencias de oxígeno en el ambiente marino en las últimas décadas (Díaz, 2001; Levin, 2003; Helly & Levin, 2004; Díaz & Rosemberg, 2008; Middelburg & Levin, 2009), el conocimiento de los mecanismos fisiológicos involucrados en la respuesta a la hipoxia ambiental pueden entregar información valiosa para predecir como los organismos marinos se desempeñan en un escenario de cambio climático (Pörtner, 2010). Así, el presente trabajo está enfocado en identificar la  $P_{cO_2}$  (presión crítica; definida como la presión parcial de oxígeno en la cual el metabolismo del animal se torna independiente del nivel de oxígeno del ambiente) en *Neotrypaea uncinata* y en base a este índice, estudiar la fisiología respiratoria de este camarón cuando es expuesto a niveles de hipoxia aguda y reoxigenación, de similar duración a la que podría experimentar en su hábitat natural.

## 1.1 Hipótesis

Teniendo en consideración las fluctuaciones que ocurren en ambientes intermareales, las respuestas adaptativas a condiciones de hipoxia exhibidas por talasínidos y los ciclos de mareas que presenta el hábitat (región sur-austral de Chile) de *Neotrypaea uncinata*, se proponen las siguientes preguntas científicas:

- ¿Cómo responde fisiológicamente *N. uncinata* a distintas presiones parciales de oxígeno?
- ¿Hasta que  $PO_2$  es esta especie capaz de regular su metabolismo?
- ¿Es esta especie capaz de recuperarse en condiciones de reoxigenación luego de estar expuesto a hipoxia aguda?
- ¿Cuándo se restablecen las condiciones basales de las distintas variables fisiológicas evaluadas?

Basados en estas preguntas, se proponen dos hipótesis:

- (i) A distintos niveles de oxígeno, *N. uncinata* muestra una regulación de su consumo de oxígeno hasta bajos niveles en la  $PO_2$  (presión parcial de oxígeno).
- (ii) En hipoxia aguda y reoxigenación, *N. uncinata* muestra una recuperación de todas las variables fisiológicas evaluadas antes de que se complete el ciclo mareal (12-hr).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 General**

Evaluar, cuantificar y describir las respuestas fisiológicas del camarón fantasma *Neotrypaea uncinata* a distintos niveles de oxígeno, así como en la hipoxia aguda y reoxigenación.

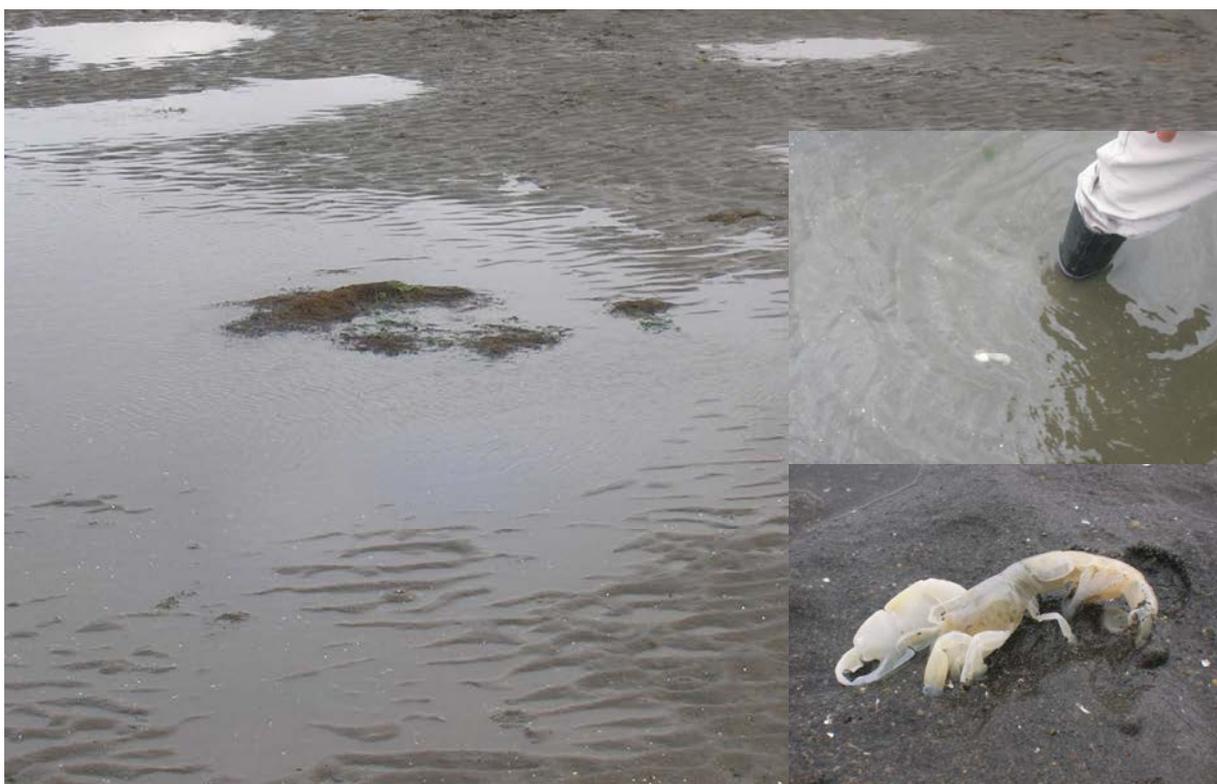
### **1.2.2 Específicos**

- Evaluar la respuesta fisiológica de *N. uncinata* a distintos niveles de oxígeno ambiental.
- Cuantificar el efecto de la hipoxia aguda en la fisiología respiratoria de *N. uncinata*
- Cuantificar el efecto de la reoxigenación en la fisiología respiratoria de *N. uncinata*.
- Comparar y describir las respuestas de *N. uncinata* dadas durante la hipoxia aguda y en la recuperación.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Animales Experimentales y Mantenimiento

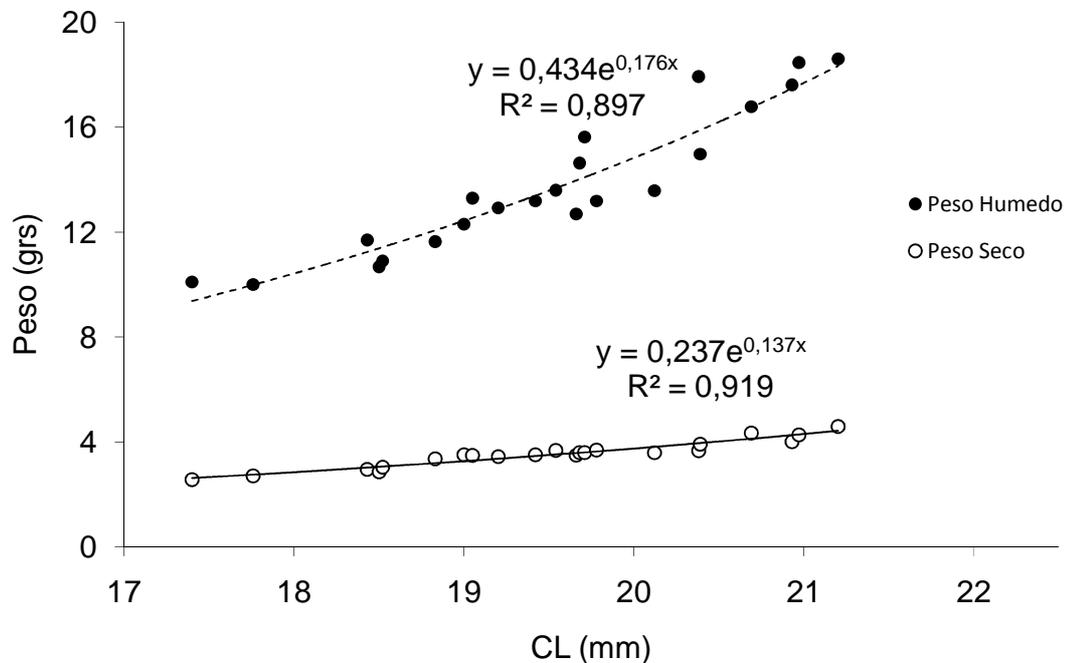
Los ejemplares de *Neotrypaea uncinata* fueron colectados durante el periodo de baja marea en la localidad de Puntilla Tenglo, Región de Los Lagos, Chile ( $41^{\circ} 28' S$ ;  $72^{\circ} 56' O$ ) usando el método de "Kiwi" descrito por Torres *et al.*, (1977), el cual consiste en marchar repetidas veces en círculos sobre superficies que contengan orificios de madrigueras. Estas últimas, fáciles de identificar debido a la presencia de pellets fecales alrededor de sus montículos (MacGinitie, 1934). Una vez que el sedimento se torna cada vez más blando, los camarones suben hasta la superficie y son tomados fácilmente con la mano (Fig. 1).



**Figura 1.** *N. uncinata*. Zona de colección del camarón fantasma en el intermareal en la localidad de Puntilla Tenglo, Puerto Montt, Chile.

Cerca de 300 camarones machos fueron colectados entre abril y julio del 2011 y posteriormente transportados en seco al Laboratorio de Ecofisiología de Crustáceos (LECOFIC), Universidad Austral de Chile, Puerto Montt, Chile y puestos en refugios individuales de PVC (350 cm<sup>3</sup> aprox.), distribuidos equitativamente en bateas de 35-L con agua de mar circulante y fotoperiodo de 12-h luz: 12-h oscuridad. Tanto la temperatura ( $11,5 \pm 0,2$  °C), salinidad ( $32,3 \pm 0,2$  psu) (WTW Cond 330i) y mortalidad fueron monitoreadas diariamente. Los camarones fueron cada día alimentados *ad libitum* con hojuelas de krill (Tropical Krill Flakes) hasta 24-hr previas al inicio de los experimentos. Se seleccionaron individuos en intermuda que no presentaran pérdida de apéndices y con ausencia de parásitos branquiales.

Antes de la distribución aleatoria de los camarones dentro de cada uno de los tratamientos experimentales, tanto el peso húmedo como el largo del cefalotórax (LC, medido a través de la línea media dorsal del cefalotórax) fueron estimados con una balanza digital (WTB-2000) y un pie de metro digital, respectivamente. El peso seco de los animales experimentales fueron determinados de una curva talla-peso seco estimados de un total de 22 animales previamente medidos, pesados y secados por 48-hrs a 60 °C en una estufa (Fig. 2).

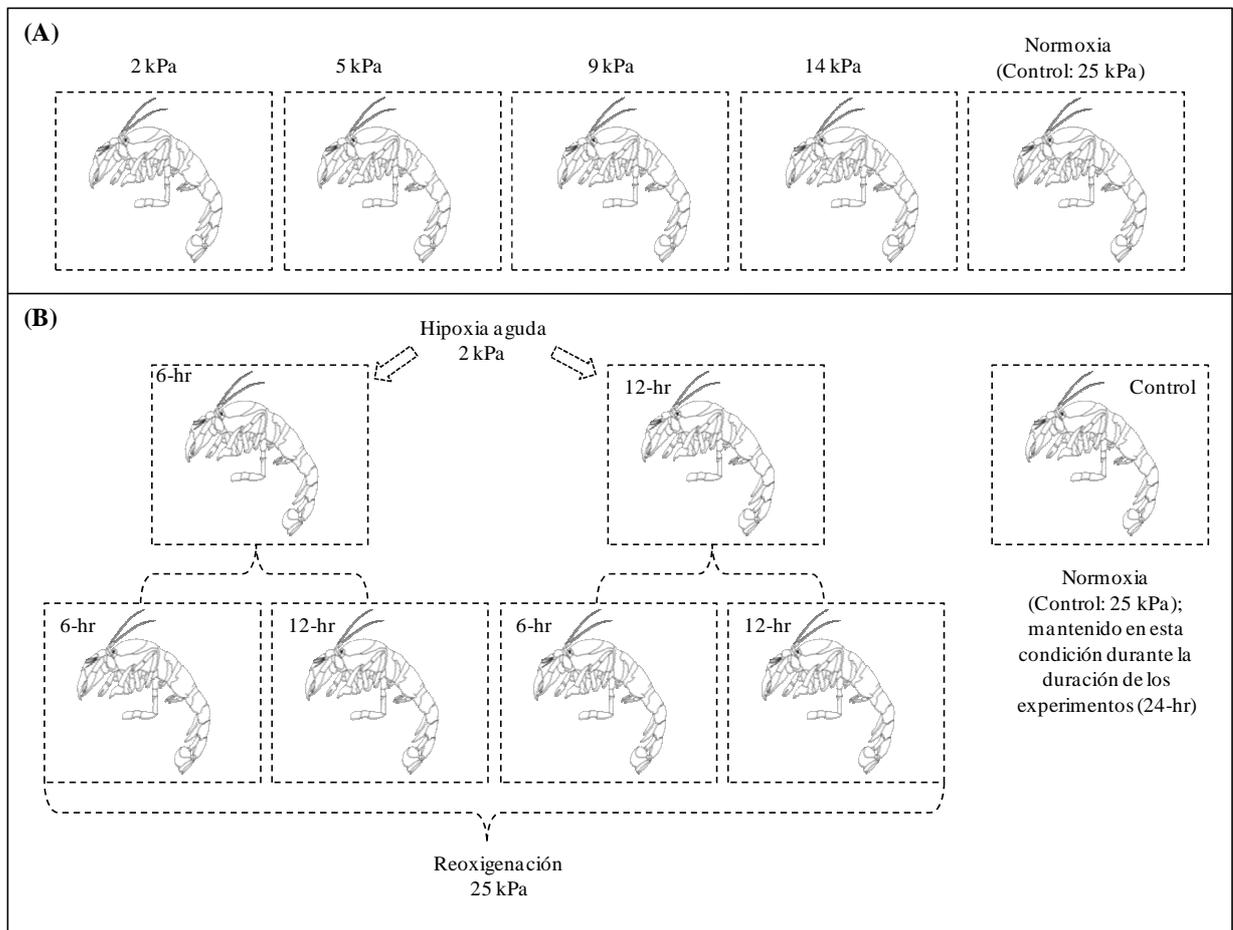


**Figura 2.** *N. uncinata*. Relación del peso húmedo y peso seco con el largo del cefalotórax (CL) en camarones fantasmas (n=22).

## 2.2 Diseño experimental

Para estudiar el efecto de distintos niveles de  $PO_2$  en las variables fisiológicas evaluadas, grupos de 6 camarones por cada nivel de oxígeno fueron incubados en cámaras herméticas de 5000-ml a 2,26; 5,03; 9,07; 13,81 y 25,35 kPa (en adelante 2, 5, 9, 14 y 25 kPa respectivamente) a 10,5 °C y 32 psu durante 6-hr (Fig. 3A). Para cuantificar el efecto de exposición a la hipoxia aguda (2 kPa) y reoxigenación (25 kPa), un set de camarones fue dividido dentro de siete grupos: (1) hipoxia 6-hr; (2) hipoxia 12-hr; (3) hipoxia 6-hr + reoxigenación 6-hr; (4) hipoxia 6-hr+ reoxigenación 12-hr; (5) hipoxia 12-hr+ reoxigenación 6-hr; (6) hipoxia 12-hr+ reoxigenación 12; (7) control,

mantenido en condiciones de normoxia durante la duración de los experimentos (Fig. 3B).



**Figura 3.** *N. uncinata*. Esquema del diseño experimental para estudiar (A) el efecto de distintos niveles de oxígeno y (B) de la hipoxia aguda y reoxigenación sobre el consumo de oxígeno y diversas variables fisiológicas cuantificadas en la hemolinfa (concentración de hemocianina, proteínas totales y lactato deshidrogenasa).

En el caso de exposiciones mayores a 6-hrs, el agua de cada uno de los replicados fue renovada totalmente mediante una manguera que conducía agua de un reservorio (400-L) con la misma condición, (2 kPa ó normoxia, según sea el caso) previamente estabilizado por 6-hr a la misma temperatura y salinidad de incubación (10,5° C, 32 psu). Debido a los distintos tiempos de incubación, los tratamientos en este experimento finalizaron en forma asincrónica. Los tiempos de exposición a cada nivel de oxígeno están relacionados con la duración máxima en terreno de una baja o alta marea, mientras que las 12-hr de exposición a una determinada condición indican un ciclo mareal completo. Todas las incubaciones fueron llevadas a cabo con iluminación constante, es decir, con 24-hr de luz y 0-hr oscuridad. El peso húmedo promedio de los camarones fue de  $15,46 \pm 1,79$  gr y el largo promedio del cefalotórax (LC) de  $20,38 \pm 0,85$  mm. No hubo diferencias significativas tanto en el peso húmedo como en el tamaño (LC) de los camarones asignados a cada uno de los tratamientos (ANOVA; P= 0,21; P=0,13).

### **2.3 Consumo de oxígeno**

Para la cuantificación del consumo de oxígeno, los camarones fueron incubados en agua de mar, previamente filtrada y esterilizada con UV, a los distintos niveles de oxígeno antes mencionados alcanzados con burbujeo de nitrógeno (con excepción de 25 kPa). La concentración de oxígeno fue cuantificada al inicio y final de periodos de 6-hr de incubación a través de un sensor óptico conectado a un oxigenómetro con compensador de temperatura Microx TX3 (PreSens) previamente calibrado en aire (100% de saturación) y con 5% de sulfito de sodio (0% de saturación). En cada cámara respirométrica, los animales fueron puestos cuidadosamente y éstas fueron tapadas

bajo la misma agua del reservorio para evitar la presencia de burbujas dentro de las mismas.

Por cada nivel de oxígeno, 3 cámaras sin animales fueron usadas como controles. Los consumos de oxígeno fueron expresados como  $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr peso seco}^{-1}$ .

## 2.4 Muestreo y Análisis de Hemolinfa

Cerca de 500- $\mu\text{l}$  de hemolinfa fueron extraídas desde la membrana artrodial de la base del 4º par de periópodos a través de una jeringa de tuberculina desechable (1-ml) y puestas en microtubos Eppendorf® (1,5-ml) mantenidos en un baño con hielo e inmediatamente congelados en un ultrafreezer (Thermo Scientific™, Forma Series 700) a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el análisis de las muestras.

Para la determinación de la concentración de oxihemocianina [Hc] (Danford *et al.*, 2002), 30- $\mu\text{l}$  de hemolinfa fueron diluidas en 970- $\mu\text{l}$  de agua ultra pura (Barnstead™, Easypure®II) en cubetas de 10-mm (1-ml) y la absorbancia fue medida a 335-nm utilizando un lector de placas (Thermo™ Multiscan Spectrum ®). Para el cálculo de la [Hc], se utilizó un coeficiente de extinción  $E_{1\text{cm}}^{mM} = 17,26$  calculado de  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2,83$  (Nickerson & Van Holde, 1971), en la base de una subunidad funcional de hemocianina de 74 kDa (Antonini & Brunori, 1974).

Para las proteínas totales en la hemolinfa se diluyeron 10- $\mu\text{l}$  de hemolinfa en 690- $\mu\text{l}$  de agua ultra pura (Barnstead™, Easypure® II). Finalmente, las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry *et al.*, (1951) (Bio-Rad DC Protein Assay Kit), modificado para microplacas de titración.

La actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) fue medida en muestras de hemolinfa cruda usando un kit comercial (Valtek S.A.) basado en el incremento proporcional de la absorbancia a 340-nm a medida que se produce NADH. El reactivo (buffer sustrato) fue resuspendido con agua ultra pura, y preincubado a 20°C en un Thermomixer® (Eppendorf). Las muestras de hemolinfa fueron diluidas en agua ultra pura en una proporción de 1:1. El cambio en la absorbancia fue medido a 340-nm durante 15 min. La actividad específica de la enzima fue expresada como unidades internacionales por miligramo de proteína, considerando un coeficiente de extinción de  $6,22 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  para el NADH.

## **2.5 Análisis de datos**

Todos los datos son presentados como promedio y desviación estándar. La normalidad y homogeneidad de varianzas fueron testeadas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Para evaluar el efecto de la  $PO_2$  y de la hipoxia aguda y reoxigenación sobre el consumo de oxígeno, [Hc], proteínas en la hemolinfa y LDH se usó un ANOVA de una vía (Zar, 2010). El test *a posteriori* de comparaciones múltiples de Tukey se realizó para determinar diferencias entre cada uno de los tratamientos. Diferencias estadísticas entre los tratamientos fueron consideradas con un valor de significancia de  $P < 0,05$ .

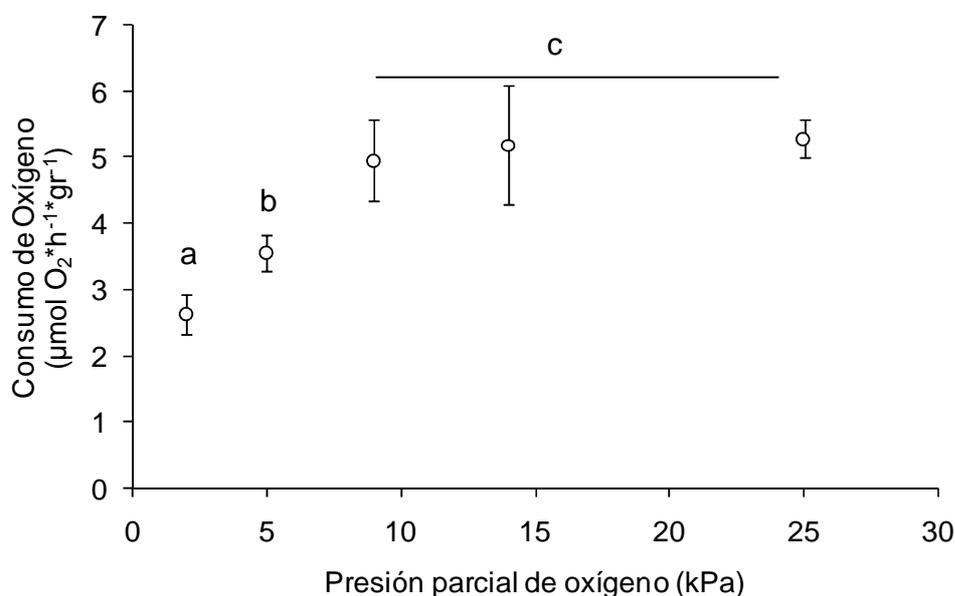
### 3. RESULTADOS

La supervivencia fue de un 100% en los camarones expuestos a distintas  $PO_2$ , en hipoxia aguda y reoxigenación.

#### 3.1 Respuesta fisiológica de *N. uncinata* a distintas $PO_2$

##### 3.1.1 Consumo de oxígeno

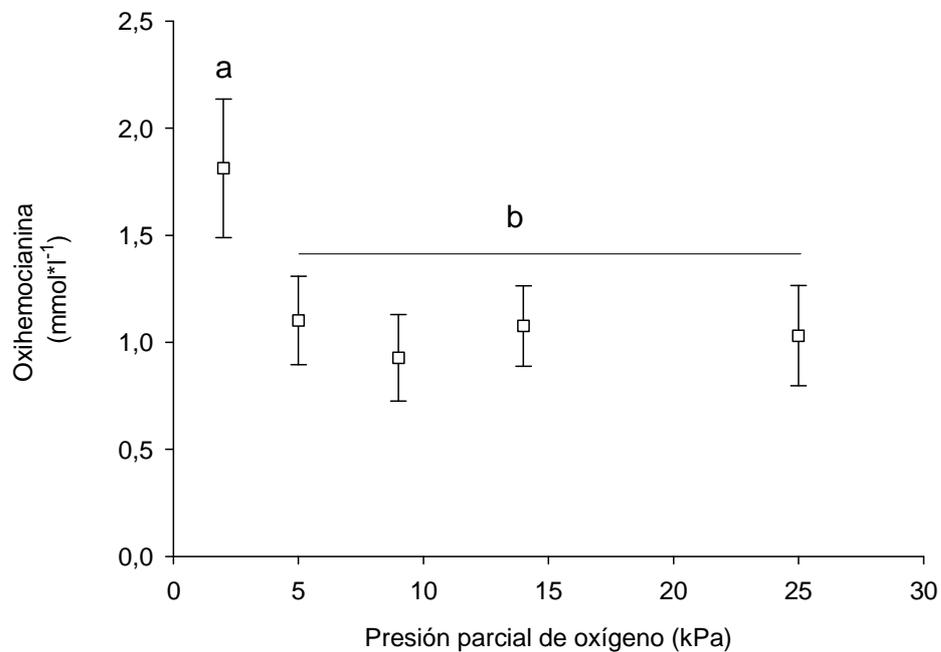
El consumo de oxígeno de los camarones fue independiente de la presión parcial de oxígeno a 9, 14 y 25 kPa, con un promedio en esta tasa de  $5,14 \pm 0,16 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$  ( $P > 0,05$ ; Fig.4). A  $PO_2$  menores que 9 kPa, los consumos de oxígeno disminuyeron significativamente, con valores promedios de  $3,56 \pm 0,26 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$  y  $2,63 \pm 0,3 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$ , para 5 kPa y 2 kPa, respectivamente ( $P < 0,05$ ; Fig.4). Considerando estos resultados, se propone como  $P_cO_2$ , una presión parcial de oxígeno entre 5 y 9 kPa.



**Figura 4.** *N. uncinata*. Consumo de oxígeno de camarones expuestos a diferentes niveles de oxígeno. Los valores son presentados como promedios ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$ )  $\pm$  desviación estándar de 6 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ).

### 3.1.2 Concentración de oxihemocianina [Hc]

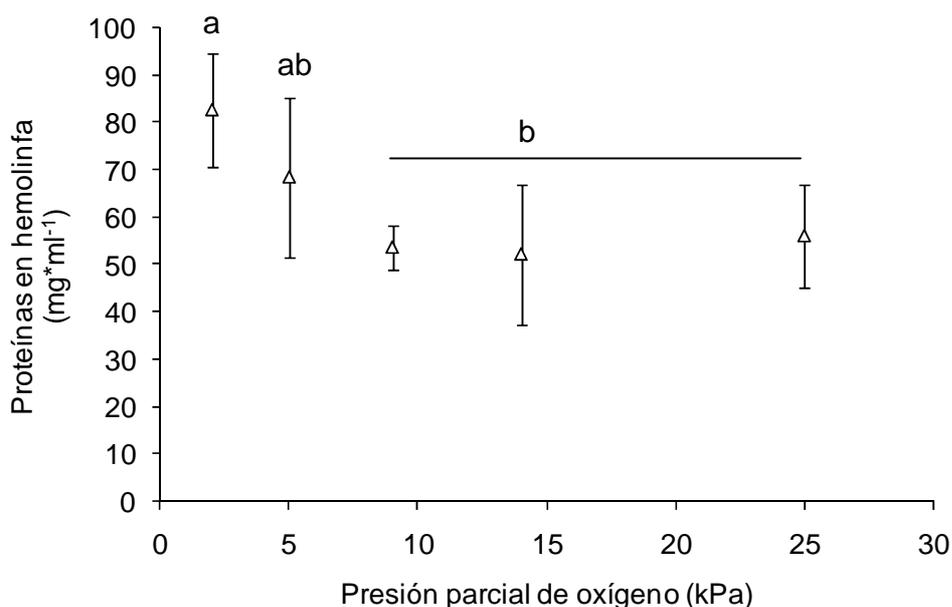
No se observaron diferencias estadísticas en los valores de la oxihemocianina en camarones expuestos a 5, 9, 14 y 25 kPa, registrándose un promedio en este rango de  $1,03 \pm 0,07 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $P>0,05$ ; Fig.5). A 2 kPa, la oxihemocianina aumentó significativamente en un 57%, con un valor de  $1,81 \pm 0,32 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  con respecto a 5, 9, 14 y 25 kPa ( $P<0,05$ ; Fig. 5).



**Figura 5.** *N. uncinata*. Concentración de oxihemocianina de camarones expuestos a diferentes niveles de oxígeno. Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 6 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P<0,05$ ).

### 3.1.3. Proteínas en hemolinfa

En camarones expuestos a 9, 14 y 25 kPa se observó un valor promedio en la concentración de proteínas de  $54 \pm 1,95 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $P>0,05$ ; Fig.6). Aunque no hubo diferencias significativas, un incremento en la concentración de proteínas en la hemolinfa fue observado a 5 kPa, con un valor de  $68,57 \pm 16,83 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , es decir, un 36% más alto que la observada a 14 kPa. El valor más alto en la concentración de proteínas fue obtenido en camarones expuestos a 2 kPa, con un promedio de  $82,8 \pm 11,97 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , significativamente distinta a la concentración presentada a 9, 14 y 25 kPa ( $P<0,05$ ), pero no se diferencia con la estimada a 5 kPa ( $P>0,05$ ; Fig. 6).

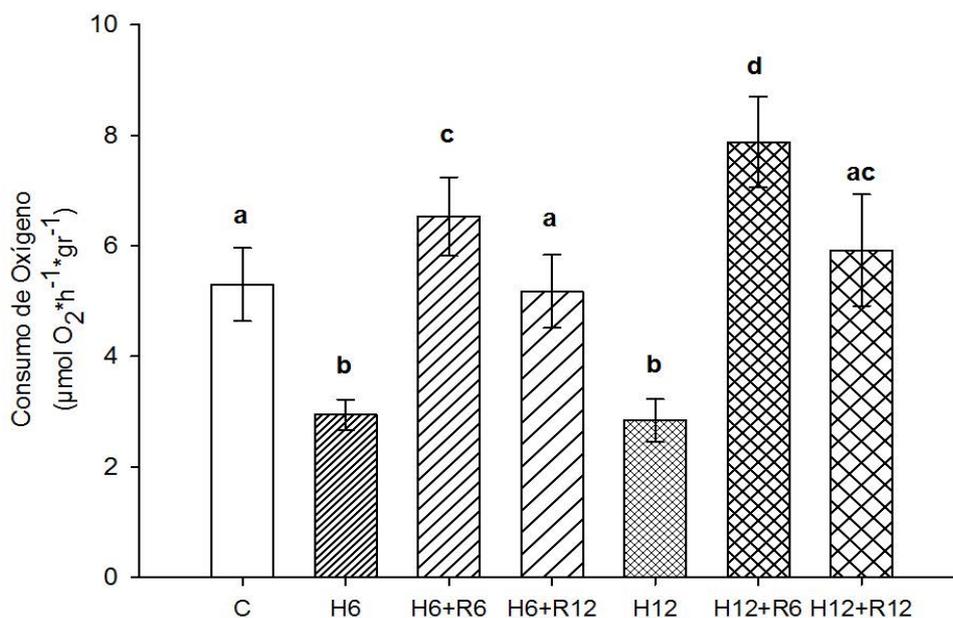


**Figura 6.** *N. uncinata*. Proteínas en la hemolinfa de camarones expuestos a diferentes niveles de oxígeno. Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 6 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P<0,05$ ).

### 3.2 Respuesta fisiológica de *N. uncinata* a la hipoxia aguda y reoxigenación.

#### 3.2.1 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno en los camarones mantenidos en hipoxia disminuyó en promedio un 54,5 % ( $P < 0,001$ ) comparados con el grupo control (normoxia), con tasas de  $2,89 \pm 0,07 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$  y  $5,29 \pm 0,65 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$ , para los tratamientos de hipoxia, 6-hr y 12-hr,) y normoxia respectivamente (Fig. 7). Con respecto al control, a las 6 horas de recuperación se observó un aumento significativo del consumo de oxígeno en camarones previamente expuestos a 6-hr y 12-hr de hipoxia, con valores de  $6,57 \pm 0,7 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$  y de  $7,87 \pm 0,81 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 7).

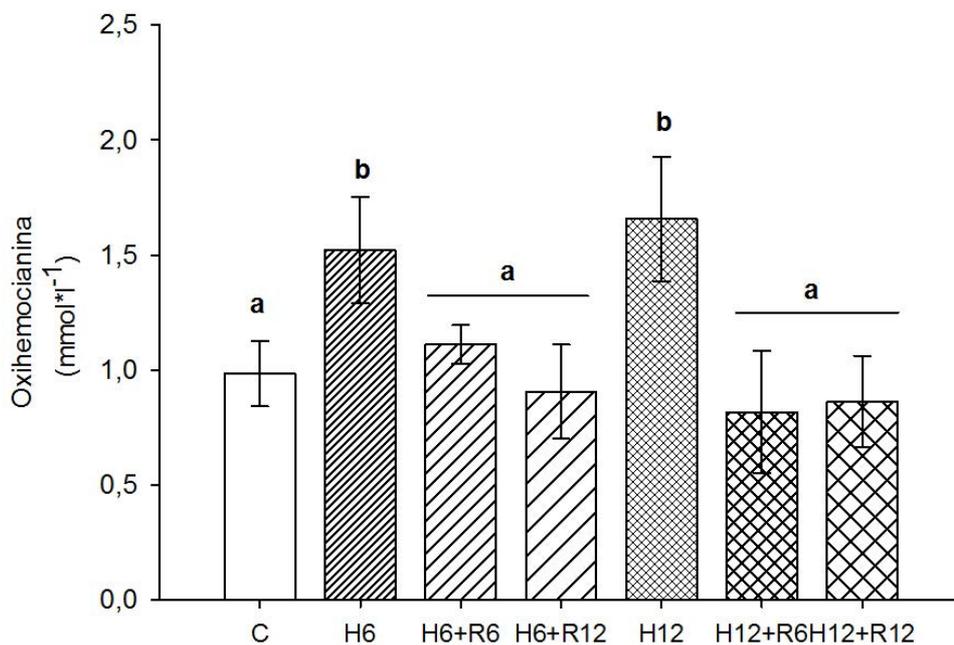


**Figura 7.** *N. uncinata*. Consumo de oxígeno de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C: control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia + 12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia+6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia+12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$  peso seco<sup>-1</sup>)  $\pm$  desviación estándar de 8 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ).

No hubo diferencias significativas con respecto al control en el consumo de oxígeno luego de 12-hr de recuperación, tanto para animales previamente mantenidos a 6-hr y 12-hr de hipoxia (Fig. 7).

### **3.2.2 Concentración de oxihemocianina [Hc]**

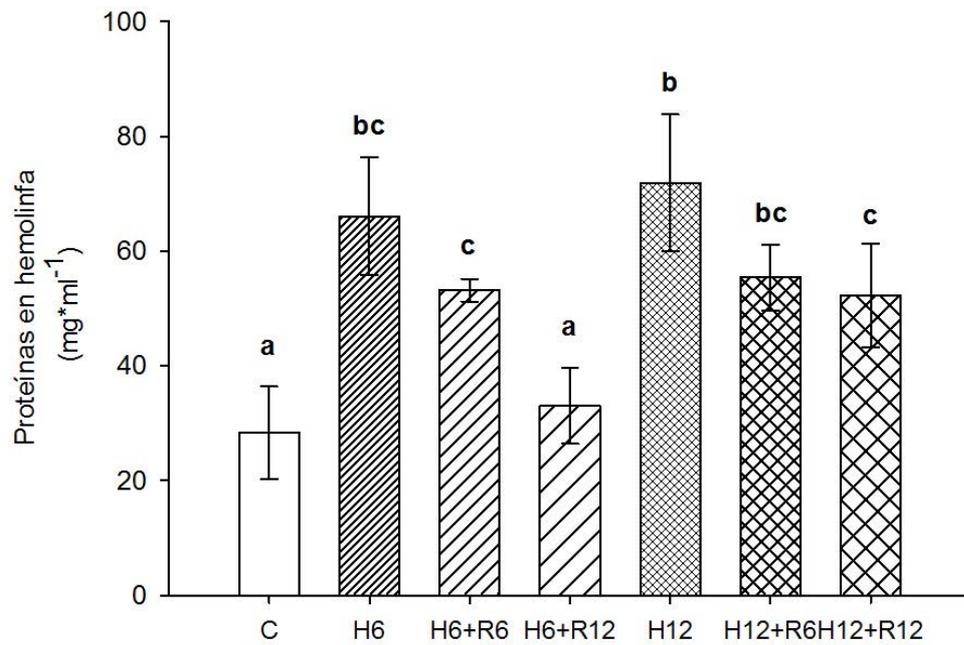
Con respecto al control, la concentración de oxihemocianina de los camarones aumentó significativamente durante la exposición a la hipoxia en un 38% ( $P < 0,001$ ), con concentraciones promedios de  $0,98 \pm 0,14 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  y  $1,58 \pm 0,09 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , para el grupo control e hipoxia, respectivamente. Aunque no se presentaron diferencias significativas entre la concentración de oxihemocianina de los camarones expuestos a 6-hr y 12-hr de hipoxia, el valor más alto en esta variable fue observada a 12-hr, con una concentración de  $1,65 \pm 0,27 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Sin embargo, en los distintos grupos de reoxigenación, no se observó un efecto significativo en la concentración de oxihemocianina ( $P > 0,05$ ; Fig. 8).



**Figura 8.** *N. uncinata*. Concentración de oxihemocianina de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C: control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia+6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia+12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia + 12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 8 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ).

### 3.2.3 Proteínas en Hemolinfa

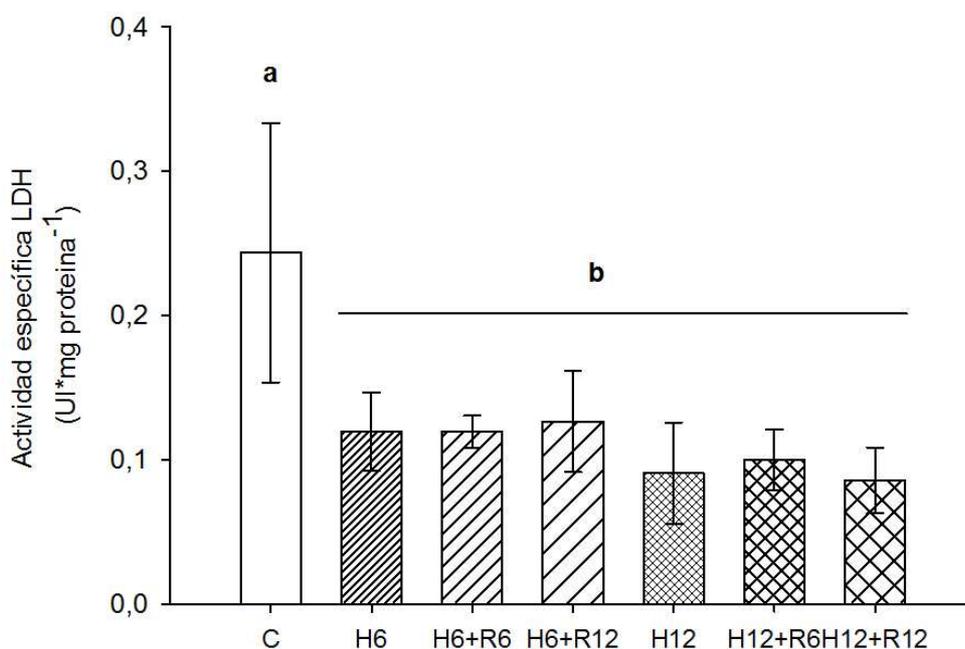
En hipoxia, las proteínas en la hemolinfa aumentaron significativamente en un 41 % ( $P < 0,001$ ) con respecto a los camarones mantenidos en el grupo control (Fig. 9), con valores promedios de  $68,97 \pm 11,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  y  $28,32 \pm 8,05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , para hipoxia y el grupo control, respectivamente. Sin embargo, para camarones mantenidos en H6+R6, hubo una disminución significativa ( $P < 0,001$ ) de las proteínas en la hemolinfa, con valores 46,7% más altos que el grupo control. Aunque una disminución de un 27,2% ocurrió a las 12-hr de reoxigenación en camarones previamente expuestos a 12-hr de hipoxia, éste valor fue significativamente más alto que el grupo control en un 45,8% ( $P < 0,05$ ; Fig. 9).



**Figura 9.** *N. uncinata*. Proteínas en la hemolinfa de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C: control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia + 12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia + 12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 5 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ).

### 3.2.4 Lactato Deshidrogenasa en hemolinfa (LDH)

La actividad específica de la lactato deshidrogenasa disminuyó en un 56% ( $P < 0,05$ ) en todos los tratamientos con respecto al grupo control (Fig. 10). En promedio, la actividad específica de la LDH fue de  $0,1 \pm 0,017$  UI\*mg proteína<sup>-1</sup> y  $0,24 \pm 0,089$  UI\*mg proteína<sup>-1</sup>, para los grupos de hipoxia/reoxigenación y el control respectivamente (Fig. 10).



**Figura 10.** *N. uncinata*. Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) de camarones expuestos a condiciones de normoxia (C:control), 6-hr de hipoxia (H6), 6-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (H6+R6), 6-hr hipoxia + 12-hr de recuperación (H6+R12), 12-hr de hipoxia (H12), 12-hr de hipoxia + 6-hr de recuperación (R12+R6) y 12-hr hipoxia +12-hr de recuperación (H12+R12). Los valores son presentados como promedios  $\pm$  desviación estándar de 5 individuos por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Respuesta fisiológica de *N. uncinata* a distintas $PO_2$

Los crustáceos decápodos varían en gran medida en su habilidad para mantener la independencia metabólica durante la hipoxia. En el camarón fantasma *N. uncinata* se encontró una presión crítica de oxígeno ( $P_{CO_2}$ ) para el consumo de oxígeno entre 4-9 kPa (Fig. 4), indicando que esta especie es más sensible a la hipoxia ambiental que otros miembros del Infraorden, pero muestra valores similares a los reportados para otros crustáceos decápodos (Tabla 1). Diferencias en los valores de  $P_{CO_2}$  ha sido explicada por una variedad de factores tanto bióticos (tamaño del animal, nivel de actividad, ciclo de la muda, oxihemocianina) como abióticos (temperatura, salinidad, estrés de laboratorio), que afectan la capacidad de los organismos marinos para responder a la hipoxia ambiental (Herreid, 1980). Para animales que viven en ambientes inestables pero predecibles en la disponibilidad de oxígeno, Childress & Seibel (1998) hipotetizaron respuestas anaeróbicas o de supresión metabólica para animales que habitan en zonas intermareales. Sin embargo, para el caso de *N. uncinata*, un camarón intermareal de hábitos excavadores, ocurren bajas tasas metabólicas en la zona de independencia metabólica (9-25 kPa:  $1,3 \pm 0,04 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$ , a  $10.5^\circ\text{C}$ ), las cuales, son 4-veces más bajas que las reportadas para *Upogebia puggetensis* (2,6-21 kPa,  $2,66 \pm 0,96 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$ , a  $10^\circ\text{C}$ ) por Thompson & Pritchard (1969). Estos bajos consumos de oxígeno podrían ser funcionalmente adaptativos para *N. uncinata* y podrían permitir a estos animales sobrevivir a bajas  $PO_2$ . Aunque esta hipótesis ha sido postulada tempranamente para *Neotrypaea californiensis* (Thompson & Pritchard, 1969), aún no es posible, aseverar que las bajas tasas

metabólicas encontradas en los talasínidos son una adaptación a un estilo de vida críptico e hipóxico, ya que en otras especies de invertebrados excavadores se observan tasas de consumo de oxígeno similares (ver revisión, Grieshaber *et al.*, 1994). Aunque datos referentes a los niveles de oxígeno *in situ* en el agua de las madrigueras de *N. uncinata* no se encuentran disponibles, para *Upogebia stellata*, que habita en el Reino Unido, se reportan valores entre 6,5-7,8 kPa, a 12°C (Astall *et al.*, 1997), los cuales están dentro del rango de  $P_{CO_2}$  observada en *N. uncinata* (5-9 kPa), lo que podría indicar que animales que normalmente experimentan hipoxia son capaces de soportar el metabolismo aeróbico hasta niveles de oxígeno críticos presentes en su ambiente (Prosser, 1954; Hochachka & Lutz, 2001; Hochachka & Somero, 2002).

**Tabla 1.** *N. uncinata*. Valores de la presión crítica de oxígeno ( $P_{cO_2}$ ) para el consumo de oxígeno dentro de diversas especies de crustáceos decápodos.

<b>Especie</b>	<b><math>P_{cO_2}</math> (kPa)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Upogebia pugettensis</i>	5.9 - 6.5	Thompson & Pritchard (1969)
<i>Neotrypaea californiensis</i>	1.3 - 3.3	Torres <i>et al.</i> , (1977)
<i>Lepidophthalmus louisianensis</i>	1.3 - 3.3	Felder (1979)
<i>Calocaris macandreae</i>	1.3 - 2.6	Anderson <i>et al.</i> , (1991)
<i>Trypaea australiensis</i>	4.8	Paterson & Thorne (1995)
<i>Neotrypaea uncinata</i>	4-9	Éste estudio
<i>Homarus americanus</i>	7.8 -10.4	McMahon & Wilkens (1975)
<i>Carcinus maenas</i>	7.8 -10.4	Hill <i>et al.</i> , 1991; Taylor, (1976)
<i>Galathea strigosa</i>	6.5	Bridges & Brand (1980)
<i>Cancer pagurus</i>	7.9 - 10.4	Bradford & Taylor (1982)
<i>Macrobrachium rosebergii</i>	8.5	Spotts (1983)
<i>Nephrops norvegicus</i>	5.2	Hagerman & Uglow (1985)
<i>Palaemon elegans</i>	2	Morris & Taylor (1985)
<i>Parastacoides tasmanicus</i>	5.2	Swain <i>et al.</i> , (1987)
<i>Munida rugosa</i>	6.5	Zainal <i>et al.</i> , (1992)
<i>Munida sarsi</i>	7.3	Zainal <i>et al.</i> , (1992)
<i>Cherax destructor</i>	1.3 - 5.3	Morris & Callaghan (1998)
<i>Procambarus pallidus</i>	3.7	Gannon <i>et al.</i> , (1999)
<i>Lithodes santolla</i>	4 - 9	Paschke <i>et al.</i> , (2010)

Una de las principales estrategias para sobrevivir en un ambiente cambiante, esta dado por la regulación fisiológica ante fluctuaciones ambientales de tipo óxicas, iónicas y/o termales (Gorr *et al.*, 2010). En crustáceos, una de las respuestas más comunes a cambios en los niveles de oxígeno ambiental es el incremento tanto en la síntesis como en afinidad de la Hc por el oxígeno durante la hipoxia (Hagerman &

Uglow, 1985; Hagerman, 1983; 1986; Hagerman & Baden, 1988; Baden *et al.*, 1990; DeFur *et al.*, 1990; Hagerman *et al.*, 1990; Terwilliger, 1998; Bridges, 2001; Spicer & Baden, 2000; 2001). En este estudio, *N. uncinata* mostró un aumento significativo en la [Hc] a 2 kPa, siendo 57% más alto que los valores registrados en el intervalo de 4-25 kPa, lo que demuestra que esta proteína puede jugar un rol importante como primera línea de defensa en situaciones de hipoxia que pudieran ocurrir por ejemplo, durante la baja marea. Del mismo modo en que aumenta la [Hc], se observa un incremento en las proteínas totales hemolinfáticas de *N. uncinata* a este mismo nivel de oxígeno.

#### **4.2 Respuesta fisiológica de *N. uncinata* a la hipoxia aguda y reoxigenación.**

Los periodos de recuperación post-hipoxia aguda son de gran importancia funcional dado que durante este tiempo las reservas de energías son restablecidas y los productos finales de la anaerobiosis son removidos o reoxidados por el organismo (Maciel *et al.*, 2008). Estudiar estos efectos en invertebrados marinos como *N. uncinata* podrían dilucidar la capacidad de este crustáceo para recuperarse dentro de periodos de tiempo que tienen directa relación con la duración del ciclo mareal. Durante la reoxigenación, numerosos procesos (por ejemplo, oxidación de productos anaeróbicos, remoción de productos tóxicos, regulación osmótica e iónica, síntesis de proteínas, regeneración de fosfágenos y reservas de ATP y restablecimiento del oxígeno disuelto físicamente), ocurren para el mantenimiento de la homeostasis y el oxígeno consumido durante este periodo es referido en la literatura como deuda de oxígeno (Herreid, 1980; Ellington, 1983). Para crustáceos, existe extensa literatura que ha mostrado una directa relación entre la duración de la hipoxia con la magnitud de la deuda de oxígeno y la

formación de productos finales del metabolismo anaeróbico (Grieshaber *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 1996; Vissman & Hagerman, 1996).

Este estudio muestra que para camarones previamente expuestos por 6-hr y 12-hr en hipoxia, la recuperación es lograda para ambos grupos antes de las 12-hr de reoxigenación, no así, en las primeras 6-hr de reoxigenación, donde una deuda de oxígeno se mantiene. Dentro de los talasínidos, no existen reportes que hayan evaluado el efecto de la hipoxia aguda y la reoxigenación en la fisiología de estos camarones. Sin embargo, para otro decápodo, Alberts & Ellington (1985) encontraron un restablecimiento de las condiciones basales del cangrejo *Mennipe mercenaria* antes de las 18-hrs de reoxigenación, previa exposición en hipoxia por 12-hr, similar a lo encontrado en este estudio para *N. uncinata*. Al igual que el experimento de exposición a distintas  $PO_2$ , tanto la [Hc] como las proteínas totales en la hemolinfa mostraron un aumento durante la exposición en hipoxia (6-hr y 12-hr). Sin embargo, para el caso de la [Hc], los valores observados en todos los tratamientos de reoxigenación son similares a los del grupo control, contrariamente a lo que ocurre con las proteínas totales. Estas últimas, a pesar de que tienden a disminuir en la reoxigenación, en ningún caso igualan las concentraciones observadas en el grupo control. En un reciente estudio, Astete-Espinoza *et al.*, (2010) evaluaron el efecto del tiempo en hipoxia sobre diversas variables fisiológicas en la hemolinfa de *N. uncinata*. Para la [Hc], al igual que en este estudio, un incremento fue observado durante la exposición en hipoxia, pero con valores más altos ( $3,72 \pm 0,18 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a los registrados en el presente trabajo para la misma especie ( $1,58 \pm 0,09 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Para las proteínas totales no encontraron un efecto de la exposición a la hipoxia, pero el valor promedio de  $75,18 \pm 2,20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  es

comparable a los obtenidos en este estudio durante la exposición a la hipoxia ( $68,97 \pm 11,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). La hemocianina es altamente variable entre y dentro de especies de crustáceos (Giomi & Beltramini, 2007) y por lo tanto, como principal proteína hemolinfática (60-90%; Rosas *et al.*, 2004), variaciones en su concentración deberían verse reflejadas en las proteínas totales circulantes. No obstante, esta relación unívoca, no es observable en *N. uncinata* durante la reoxigenación, lo que puede deberse a la heterogeneidad molecular propia de las subunidades de hemocianina descrita para varias especies de crustáceos, las cuales varían enormemente en su peso molecular (71,6 - 93,7 kDa para talasinidos; Taylor *et al.*, 2000). Aunque en este estudio, no se cuantificó la concentración de lactato en la hemolinfa, si se determinó la actividad específica de la LDH, la cual, es un indicador de la capacidad de realizar metabolismo anaeróbico. Esta enzima, que cataliza la formación de lactato a partir de piruvato o viceversa (Nelson & Cox, 2004), no se vió afectada ni por la hipoxia ni por la reoxigenación, pero si una disminución en su actividad fue observada en estos tratamientos con respecto al control, con valores similares a los reportados por Astete-Espinoza *et al.*, (2010) de  $0,47 \pm 0,06 \text{ UI}\cdot\text{mg proteínas}^{-1}$  y  $0,24 \pm 0,089 \text{ UI}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$  (este estudio). Las altas concentraciones de proteínas durante la hipoxia hicieron finalmente que la actividad específica de la LDH no presentara diferencias estadísticas con respecto a los otros grupos.

## 5. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se describen por primera vez las respuestas fisiológicas de *N. uncinata* a distintos niveles de oxígeno ambiental, así como durante la reoxigenación. Este camarón, muestra una variedad de cambios en casi todas las variables fisiológicas evaluadas, fluctuando desde una regulación de su consumo de oxígeno a distintos  $PO_2$ , aumentos en las concentraciones oxihemocianina y de proteínas, y una recuperación de la hipoxia aguda (2 kPa) antes de que se complete el ciclo mareal. Para el consumo de oxígeno, una  $P_cO_2$  entre 4-9 kPa es sugerida.

Los resultados indican que esta especie de camarón excavador muestra rápidas respuestas para contrarrestar el déficit de oxígeno, mostrando una rápida recuperación de la hipoxia aguda, que en su conjunto podrían permitir a estos decápodos contrarrestar la deficiencia de oxígeno producida durante la marea baja.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- o ALBERTS, J.L., W.R. ELLINGTON. 1985. Pattern of energy metabolism in the stone crab, *Menippe mercenaria* during severe hypoxia and subsequent recovery. *J. Exp. Zool.* 234, 175-183.
- o ANDERSON, S.J., R.J.A. ATKINSON, A.C. TAYLOR. 1991. Behavioural and physiological adaptations of the mud-burrowing shrimp *Calocaris macandreae* (Thalassinidea; Crustacea) to the burrow environment. *Ophelia* 34: 143-156.
- o ANDERSON, S.J., A.C. TAYLOR, R.J.A. ATKINSON. 1994. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 515-522.
- o ANTONINI, E., M. BRUNORI. 1974. Transport of oxygen: respiratory protein. En: Molecular Oxygen in Biology. Topics in Molecular Oxygen Research. Hayashi (ed). North Holland, Amsterdam. 219-274.
- o ASTALL, C.M., A.C. TAYLOR, R.J.A. ATKINSON. 1997. Behavioural and Physiological Implications of a Burrow-dwelling Lifestyle for Two Species of Upogebiid Mud-shrimp (Crustacea: Thalassinidea). *Estuar. Coast. Shelf S* 44, 155-168.
- o ASTETE-ESPINOZA, L., C. GARRIDO, C. CACERES. 2010. Respuestas fisiológicas de *Neotrypaea uncinata* (Decapoda: Thalassinidea) a la hipoxia y al parasitismo por *Lonella agassizi* (Isopoda: Epicaridea). *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* 45, 423-431.

- o ATKINSON, R.J.A., A.C. TAYLOR. 1988. Physiological ecology of burrowing decapods. En: Aspects of Decapod Crustacean Biology, A.A. Fincham & P.S. Rainbow (eds). Oxford: Clarendon Press. Symposium of the Zoological Society of London. 59, 201-226.
- o ATKINSON, R.J.A, A.C. TAYLOR, 2005. Aspects of the physiology, biology and ecology of thalassinidean shrimps in relation to their burrow environment. *Ocean. Mar. Biol. Ann. Rev.* 43, 173-210.
- o BADEN, S.P., L. PIHL, R. ROSENBERG. 1990. Effects of oxygen depletion on the ecology, blood physiology and fishery of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 141-155.
- o BOURGEOIS, R.P., D.L. FELDER. 2001. Postexposure metabolic effects of sulfide and evidence of sulfide-based ATP production in callinassid ghost shrimp (Crustacea: Decapoda: Thalassinidea). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263, 105–121.
- o BRADFORD, S.M., A.C. TAYLOR. 1982. The respiration of *Cancer pagurus* under normoxic and hypoxic conditions. *J. Exp. Biol.* 97, 273-288.
- o BRIDGES, C.R. 2001. Modulation of the haemocyanin oxygen affinity: properties and physiological implications in a changing world. *J. Exp. Biol.* 204, 1021-1032.
- o BRIDGES, C.R., A.R. BRAND. 1980. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate level of some marine crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 65A, 309-409.

- o BURNETT, L., W. STICKLE. 2001. Physiological responses to hypoxia. En: Coastal Hypoxia. Consequences for Living Resources and Ecosystems. Coastal and Estuarine Studies. N. Rabalais & E. Turner (eds). American Geophysical Union, Washington, D.C. 58, 101-114.
- o CHILDRESS, J.J., B.A. SEIBEL. 1998. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J. Exp. Biol.* 201, 1223-1232.
- o CONGLETON, J.L. 1974. The respiratory response to asphyxia of *Typhlogobius californiensis* (Teleostei: Gobiidae) and some related gobies. *Biol. Bull.* 146, 186-205.
- o DANFORD, A.R., L. HAGERMAN, R.F. UGLOW. 2002. Effect of emersion and elevated hemolymph ammonia on hemocyanin-oxygen affinity of *Cancer pagurus*. *Mar. Biol.* 141, 1019-1027.
- o DEFUR, P.L. 1988. Systemic respiratory adaptations to air exposure in intertidal decapod crustaceans. *Am. Zool.* 28: 431-444.
- o DEFUR, P.L., C.P. MANGUM, J. E. REESE. 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. *Biol. Bull.* 178, 46-54.
- o DENNY, M., S. GAINES. 2007. Encyclopedia of Tidepools and Rocky Shores. University of California Press. 739 pp.
- o DIAZ, R.J. 2001. Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Qual.* 30, 275-281.
- o DIAZ, R.J., R. ROSENBERG. 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926-929.

- o ELLINGTON, W.S. 1983. The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. *J. Exp. Zool.* 228, 431-444.
- o FARLEY, R.D., J.F. CASE. 1968. Perception of external oxygen by the burrowing shrimp *Callinassa californiensis* Dana and *Callinassa affinis* Dana. *Biol. Bull.* 134, 261-265.
- o FELDER, D.L. 1979. Respiratory adaptations of the estuarine mud shrimp, *Callinassa jamaicense* (Schmitt, 1935) (Crustacea, Decapoda, Thalassinidea). *Biol. Bull.* 157, 125-137.
- o GANNON, A.T., V. DEMARCO, T. MORRIS, M. WEATHLY, Y-H. KAO. 1999. Oxygen uptake, critical oxygen tension, and available oxygen of three species of Cave crayfishes. *J. Crustacean Biol.* 19, 235-243.
- o GIOMI, F., M. BELTRAMINI. 2007. The molecular heterogeneity of hemocyanin: Its role in the adaptive plasticity of Crustacea. *Gene* 398, 192-201..
- o GORR, T.A., D. WICHMANN, J. HU, M. HERMES-LIMA, A. F. WELKER, N. TERWILLIGER, J. F. WREN, M. VINEY, S. MORRIS, G. E. NILSSON, A. DETEN, J. SOLIZ., M. GASSMANN. 2010. Hypoxia Tolerance in Animals: Biology and Application. *Physiol. Biochem. Zool.* 83,733-752.
- o GRIESHABER, M., I. HARDEWIG, U. KREUTZER, H.O. PÖRTNER. 1994. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 125, 43-147.
- o HAGERMAN, L. 1983. Haemocyanin concentration in juvenile lobsters (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding condition. *Mar. Biol.* 77, 11-17.

- o HAGERMAN, L. 1986. Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L.) after exposure to moderate hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 85A, 721-724.
- o HAGERMAN, L., S.P. BADEN. 1988. *Nephrops norvegicus*: field study on the effects of oxygen deficiency on haemocyanin concentration. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 135-142.
- o HAGERMAN, L., R.F. UGLOW. 1985. Effect of hypoxia on the respiratory and circulatory regulation of *Nephrops norvegicus*. *Mar. Biol.* 87, 273-278.
- o HAGERMAN, L. 1998. Physiological flexibility; a necessity for life in anoxic and sulphidic habitat. *Hydrobiologia* 375/376, 241-254.
- o HAGERMAN, L., T. SØNDERGAARD, K. WEILE, D. HOSIE, R.F. UGLOW. 1990. Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephrops norvegicus* under hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A, 51-55.
- o HELLY, J., L. LEVIN. 2004. Global Distribution of Naturally Occurring Marine Hypoxia on Continental Margins. *Deep-sea Res PT I* 51, 1159-1168.
- o HERREID, C.F. 1980. Review. Hypoxia in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 67A, 331-320.
- o HILL, B. 1981. Respiratory adaptations of three species of *Upogebia* (Thalassinidea, Crustacea) with special reference to low tide periods. *Biol. Bull.* 160, 272-279.
- o HILL, A.D., A.C. TAYLOR, R.H.C. STRANG. 1991. Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 150, 31-50.

- o HOCHACHKA, P.W., P. LUTZ. 2001. Mechanism, origin and evolution of the anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 130B, 435-459.
- o HOCHACHKA, P.W., G.N. SOMERO. 2002. Biochemical Adaptation. Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, New York. 466 pp.
- o HOCHACHKA, P. W., C. L. BEATTY, Y. BURELLE, M. E. TRUMP, D. C. MCKENZIE, G. O. MATHESON. 2002. The Lactate Paradox in Human High-Altitude Physiological Performance. *News Physiol. Sci.* 17, 122-126.
- o HOLMAN, J.D. 2006. Anoxia tolerance, anaerobic metabolism, and the lack of a mitochondrial permeability transition in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis*, Schmitt, 1935. Master of Science Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 47 pp.
- o HOLMAN, J.D., S. HAND. 2009. Metabolic depression is delayed and mitochondrial impairment averted during prolonged anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 376, 85-93.
- o LEVIN, L. 2003. Oxygen minimum zones benthos: Adaptation and community responses to hypoxia. *Ocean. Mar. Biol. Ann. Rev.* 41, 1-45.
- o LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- o MACGINITIE, G.E. 1934. The natural history of *Callinassa californiensis* Dana. *Amer. Midland Nat.* 15, 166-177.

- o MACIEL, J.E., F. SOUZA, S. VALLE, L.C. KUCHARSKI, R.S. MARTINS. 2008. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulata* during hypoxia and post-hypoxia recovery. *Comp. Biochem. Physiol.* 151A, 61-65.
- o MCMAHON, B., J.L. WILKENS. 1975. Respiratory and circulatory responses to hypoxia in the lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 62, 637-655.
- o MCMAHON, B. 1988. Physiological responses to oxygen depletion in intertidal animals. *Am. Zool.* 28, 39-53.
- o MIDDELBURG, J.J., L.A. LEVIN. 2009. Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. *Biogeosciences* 6, 1273-1293.
- o MILLER, K.I., K.E. VAN HOLDE. 1974. Oxygen Binding by *Callinassa californiensis* Hemocyanin. *Biochemistry* 13, 1668-1678.
- o MILLER, K.I., K.E. VAN HOLDE. 1981. The effect of environmental variables on the structure and function of hemocyanin from *Callinassa californiensis*. 1. Oxygen binding. *J. Comp. Physiol.* 143, 253-260.
- o MILLER, K.I., A.W. PRITCHARD, P.S. RUTLEDGE. 1976. Respiratory regulation and the role of the blood in the burrowing shrimp *Callinassa californiensis* (Decapoda: Thalassinidea). *Mar. Biol.* 36, 233-242.
- o MILLER, K.I., N.W. ELDRED, F. ARISAKA, K.E. VAN HOLDE. 1977. Structure and function of hemocyanin from thalassinid shrimp. *J. Comp. Physiol.* 115B, 171-184.
- o MORRIS, S., A.C. TAYLOR. 1985. The respiratory response of the intertidal prawn *Palaemon elegans* (Rathke) to hypoxia and hyperoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A, 633-639.

- o MORRIS, S., J. CALLAGHAN. 1998. Respiratory and metabolic responses of the Australian Yabby *Cherax destructor* to progressive and sustained environmental hypoxia. *J. Comp. Physiol.* 168B, 377-388.
- o MUKAI, H., I. KOIKE. 1984. Behaviour and respiration of the burrowing shrimps *Upogebia major* (De Haan) and *Callinassa japonica* (De Haan). *J. Crustacean Biol.* 4, 191–200.
- o NELSON, D., M. COX. 2004. Lehninger. Principles of Biochemistry. 4<sup>th</sup> edition. Freeman W. H. 1100 pp.
- o NICKERSON, K.W., K. VAN HOLDE. 1971. A comparison of molluscan and arthropods hemocyanin- I. Circular dichroism and absorption spectra. *Comp. Biochem. Physiol.* 39B, 855-872.
- o NOVOA, F., G. RUIZ, M. ROSENMAN. 2003. El oxígeno y la vida en alta latitud: Adaptaciones en vertebrados terrestres. En: Bozinovic, F. (eds): Fisiología ecológica y evolutiva: Teoría y casos de estudio en animales. Ediciones Universidad Católica. 227-246.
- o NYBAKKEN J. W. 2000. Marine Biology: An Ecological Approach. 5<sup>th</sup> edition Benjamin Cummings. 516 pp.
- o PAOLI, M., F. GIOMI, N. HELLMANN, E. JAENICKE, H. DECKER, P. DI MURO, M. BELTRAMINI. 2007. The molecular heterogeneity of hemocyanin: Structural and functional properties of the 4 × 6-meric protein of *Upogebia pusilla* (Crustacea). *Gene* 398: 177-182.

- o PASCHKE, K., J.P. CUMILLAF, S. LOYOLA, P. GEBAUER, M. URBINA, M.E. CHIMAL, C. PASCUAL, C. ROSAS. 2010. Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda: Lithodidae). *Mar. Biol.* 157, 7-18.
- o PATERSON, B.D., M.J. THORNE. 1995. Measurements of oxygen uptake, heart and gill bailer rates of the callianassid burrowing shrimp *Trypaea australiensis* Dana and its responses to low oxygen tensions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194, 39-52.
- o PÖRTNER, H.O. 2010. Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix of integrating climate-related stressor effect in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881-893.
- o PRITCHARD, A. W., S. EDDY. 1979. Lactate formation in *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis* (Crustacea: Thalassinidea). *Mar. Biol.* 50, 249-253.
- o PROSSER, L. 1954. Physiological Variation in Animals. *Biol. Rev.* 50, 229-261.
- o RICHARDS, J. 2011. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 214, 191-199.
- o ROSAS, C., E.L. COOPER, C. PASCUAL, R. BRITO, R. GELABERT, T. MORENO, G. MIRANDA, A. SANCHEZ. 2004. Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea: Penaeidae). *Mar. Biol.* 145, 401-413.

- o ROXBY, R., K.I. MILLER, D.P. BLAIR, K.E. VAN HOLDE. 1974. Subunits and association equilibria of *Callinassa californiensis* hemocyanin. *Biochemistry* 13, 1662-1668.
- o SCHMIDT-NIELSEN, K. 1997. Animal Physiology. Adaptation and Environment. Cambridge University Press. 5<sup>th</sup> edition. 612 pp.
- o SPICER, J.I., S.P. BADEN. 2000. Natural variation in the concentrations of haemocyanin from three decapod crustaceans, *Nephrops norvegicus*, *Liocarcinus depurator* and *Hyas aranaeus*. *Mar. Biol.* 136, 55-61.
- o SPICER, J.I., S.P. BADEN. 2001. Environmental hypoxia and haemocyanin variability in Norway lobsters *Nephrops norvegicus* (L.). *Mar. Biol.* 139, 727-734.
- o SPOTTS, D.G. 1983. Oxygen consumption and whole body lactate accumulation during progressive hypoxia in the tropical freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Exp. Zool.* 226, 19-27.
- o STAMHUIS, E.J., J.J. VIDELER. 1998a. Burrow ventilation in the tube-dwelling shrimp *Callinassa subterranea* (Decapoda: Thalassinidea) I. Morphology and motion of the pleopods, uropods and telson. *J. Exp. Biol.* 201, 2151–2158.
- o STAMHUIS, E.J., J.J. VIDELER. 1998b. Burrow ventilation in the tube-dwelling shrimp *Callinassa subterranea* (Decapoda: Thalassinidea) II. The flow in the vicinity of the shrimp and the energetic advantages of a laminar non-pulsating ventilation current. *J. Exp. Biol.* 201, 2159-2170.
- o STAMHUIS, E.J., J.J. VIDELER. 1998c. Burrow ventilation in the tube-dwelling shrimp *Callinassa subterranea* (Decapoda: Thalassinidea) III. Hydrodynamic modelling and the energetics of pleopod pumping. *J. Exp. Biol.* 201, 2171-2181.

- o STILLMAN, J. 2002. Causes and Consequences of Thermal Tolerance Limits in Rocky Intertidal Porcelain Crabs, Genus *Petrolisthes*. *Integ. Comp. Biol.* 42, 790-796.
- o SWAIN, R., P.F. MARKER, M.M. RICHARDSON. 1987. Respiratory response to hypoxia in stream-dwelling (*Astacospis franklinii*) and burrowing (*Parastacoides tasmanicus*) parastacid crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A, 813-817.
- o TAYLOR, A.C. 1976. The respiratory responses of *Carcinus maenas* to declining oxygen tension. *J. Exp. Biol.* 65, 309-322.
- o TAYLOR, A.C., C.M. ASTALL, R.J.A. ATKINSON. 2000. A comparative study of the oxygen transporting properties of the haemocyanin of five species of thalassinidean mud-shrimps. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 244, 265-283.
- o TERWILLIGER, N. 1998. Functional adaptations of oxygen-transport protein. *J. Exp. Biol.* 201, 1085-1098.
- o THOMPSON, R.K., A.W. PRITCHARD. 1969. Respiratory adaptations of two burrowing crustaceans, *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis* (Decapoda, Thalassinidea). *Biol. Bull.* 136, 274-287.
- o THATJE, S. 2003. Review of the Thalassinidea (Crustacea: Decapoda) from Chile and Argentina. *An. Inst. Pat.* 31, 115-122.
- o TORRES, J.J., D.L. GLUCK, J.J. CHILDRESS. 1977. Activity and physiological significance of the pleopods in the respiration of *Callinassa californiensis* (Dana) (Decapoda, Thalassinidea). *Biol. Bull.* 136, 274-287.

- o TRUCHOT, J.P., A. DOUHAMEL-JOUVE. 1980. Oxygen and carbon dioxide in the marine intertidal environment: diurnal and tidal changes in rockpools. *Resp. Physiol.* 39, 241-245.
- o VAQUER-SUNYER, R., C.M. DUARTE. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15452-15457.
- o VAQUER-SUNYER, R., C.M. DUARTE. 2010. Temperature effects on oxygen thresholds for hypoxia in marine benthic organisms. *Global Change Biol.* 17, 1788-1797.
- o VISSMAN, B. L. HAGERMAN. 1996. Recovery from hypoxia with and without sulphide in *Saduria entomon*: oxygen debt, reduced sulfur and anaerobic metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 143, 131-139.
- o WILLMER, P., G. STONE, I. JOHNSON. 2005. Environmental Physiology of Animals. 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell Science, Ltd. Oxford. 779 pp.
- o ZAINAL, K.A., A.C. TAYLOR, R.J.A. ATKINSON. 1992. The effect of temperature and hypoxia on the respiratory physiology of the squid lobster *Munida rugosa* and *Munida sarsi* (Anomura: Galatheidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 101A, 557-567.
- o ZAR, J. 2010. Biostatistical Analysis. 5<sup>th</sup> edition. Pearson Prentice Hall. 947 pp.
- o ZEBE, E. 1982. Anaerobic metabolism in *Upogebia pugettensis* and *Callianassa californiensis* (Crustacea: Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 613-617.
- o ZIEBIS, W., S. FORSTER, M. HUETTEL, B.B. JORGENSEN. 1996. Complex burrows of *Callianassa truncata*. *Nature* 382, 619-622.

- o ZOU, E., N. DU, W. LAI. 1996. The effect of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 114A, 105-109.