

1996 B - 2001B

039604113

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS

BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



DESEMPEÑO DE LA LANGOSTA ROJA, *Panulirus interruptus*
Randall, 1840, DURANTE HIPOXIA PROGRESIVA

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

DÉBORA GUADALUPE PATIÑO GUTIÉRREZ

Las Agujas, Zapopan, Jal., Febrero del 2002

11220/0221
18662/0221
DÉBORA PATIÑO GUTIÉRREZ



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. DEBORA GUADALUPE PATIÑO GUTIÉRREZ
P R E S E N T E .

Manifiesto a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de Tesis con el título "DESEMPEÑO DE LA LANGOSTA ROJA, *Panulirus interruptus*, Randall, 1840 DURANTE HIPOXIA PROGRESIVA ", para obtener la Licenciatura en Biología.

Ai mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo la DRA. LUCÍA OCAMPO VICTORIA y como asesor el M.C. EDUARDO JUÁREZ CARRILLO.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 24 de septiembre del 2001

DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Leticia Hernández López
M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. DRA. LUCÍA OCAMPO VICTORIA. - Director del Trabajo
c.c.p. M.C. EDUARDO JUÁREZ CARRILLO.-Asesor del Trabajo
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

Forma C

C. DRA. MONICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACION DE LA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizo la pasante : DÉBORA GUADALUPE PATIÑO GUTIÉRREZ con el titulo: "DESEMPEÑO DE LA LANGOSTA ROJA, *Panulirus interruptus* Randall, 1840, DURANTE HIPOXIA PROGRESIVA", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que podemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

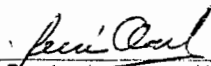
Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 12 de Febrero del 2002.

EL DIRECTOR DE TESIS


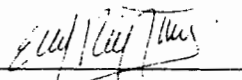
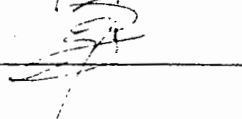
EL ASESOR


Dra. Lucia Ocampo Victoria
Carrillo


M en C. Eduardo Juárez

SINODALES

1. M.C. Miguel Carvajal Soria
2. DR. Eduardo Rios Jara
3. M.C. Elva Gpe. Robles Jareo

**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE**

(CIBNOR, Instituto Federal Sep- CONACYT, La Paz, B. C. S)

Directora: Dra. Lucía Ocampo Victoria

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a:

La Dra. Ocampo la oportunidad ofrecida para la realización del presente trabajo, así como sus enseñanzas, apoyo, dedicación y orientación.

Al proyecto CONACYT, CLAVE: J31677B "Aspectos de la fisiología de crustáceos de importancia comercial con relación al transporte vivo" por la beca para realizar este trabajo.

A la M.C. Diana Carreño y M.C. Roberto Hernández por la especial colaboración en la área de laboratorio.

Al M.C. Eduardo Juárez por su apoyo incondicional y su amistad.

A todos los Maestros del laboratorio de Ecosistemas Marina y Acuicultura por su apoyo y amistad. Ríos J, Martín P, Arturo N, Lupita R, Ernesto L, Ildelfonso, Martín H y Alejandro M.

A todos mis compañeros de trabajo por su afecto y buenos deseos, en especial a Katy Ramírez, Itzel Sifuentes y Rafael Ortiz.

DEDICATORIA

A mis padres

Por su cariño y apoyo en todo lo que emprendo. En especial, a mi Mamá Ma. de la Luz por siempre apoyarme como amiga y madre y a mi padre Humberto por apoyarme en lo que siempre emprendo.

A Dios

Te doy gracias por siempre apoyarme y el estar conmigo en las buenas y en las malas, con su bendición.

A mi novio Arturo Licon

Por su amor, paciencia; sincero apoyo que me brindó en todo momento y un cariño sincero.

A mis amigos

Por poder contar siempre con ellos cuando los necesitaba con su, amistad y apoyo. En especial a Vero, Sandra; Pau, Celina y Miriam.

A mis Tíos

Por estar conmigo en mis logros y fracasos. En especial a mi Tía Carmen, por ser mi amiga incondicionalmente y sobre todo apoyo en varios aspectos.

RESUMEN

La langosta roja, *Panulirus interruptus*, sostiene la pesquería en Baja California Sur y ha logrado penetrar al mercado internacional como producto vivo. Con el objetivo de evaluar la capacidad fisiológica y el desempeño de la langosta roja cuando es sometida a hipoxia progresiva se realizaron mediciones del consumo de oxígeno y evaluaciones de los principales combustibles metabólicos a dos temperaturas de aclimatación en muestras de sangre obtenidas de la región del pericardio y del pereiópodo de la langosta durante normoxia, hipoxia y en el punto crítico de oxígeno (Pc).

El consumo de oxígeno en normoxia fue constante e independiente del oxígeno disuelto hasta 1.77 mg/L a 20 °C mientras que a 27 °C hasta 2.66 mg/L. La temperatura tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) en el Pc. El consumo durante hipoxia es aproximadamente el 10% del consumo durante normoxia. No existió diferencia significativa entre el sitio de toma de hemolinfa y la temperatura ($P > 0.05$) en los combustibles metabólicos, sin embargo existe un efecto significativo debido a la condición de oxígeno ($P < 0.05$). El lactato varió de 0.0067 a 0.2919 (mg/ml) a 20 °C y de 0.0227 a 0.2927 (mg/ml) a 27 °C y aumentó significativamente durante hipoxia ($P < 0.05$). La glucosa varió de 0.0960 a 0.2687 (mg/ml) a 20 °C y de 0.1327 a 0.3310 (mg/ml) a 27 °C y aumentó significativamente por efecto de la temperatura ($P < 0.05$). Los carbohidratos variaron de 0.1450 a 1.1164 (mg/ml) a 20 °C y de 0.2451 a 0.8790 (mg/ml) a 27 °C y aumentaron significativamente durante hipoxia ($P < 0.05$). Las proteínas variaron de 80.78 a 119.99 (mg/ml) a 20 °C y de 82.99 a 130.30 (mg/ml) a 27 °C. La tendencia fue a disminuir las proteínas por efecto de la condición de oxígeno, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la temperatura, el sitio de toma de hemolinfa y la condición de oxígeno.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVOS.....	9
HIPÓTESIS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Colecta de los organismos experimentales	11
Mantenimiento de los organismos experimentales	11
Temperaturas experimentales	11
Sistema de respirometría	12
Mediciones de consumo de oxígeno	12
Toma de muestras de hemolinfa	13
Análisis estadístico	14
RESULTADOS	15
Metabolismo respiratorio	15
Combustibles metabólicos	17
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	28
GLOSARIO.....	29
BIBLIOGRAFÍA	30
ANEXO.....	34

ÍNDICE DE FIGURA Y TABLAS

Figura. 1 Efecto del consumo de oxígeno a 20 °C	15
Figura. 2 Efecto de consumo de oxígeno a 27 °C	16
Tabla. 1 Ecuaciones para estimar el Pc	17
Tabla. 2 Combustibles metabólicos a 20 °C	18
Tabla.3 Combustibles metabólicos a 27°C	19
Figura. 3 Concentración de lactato	20
Figura. 4 Concentración de glucosa	21
Figura. 5 Concentración de carbohidratos	22
Figura. 6 Concentración de proteína	23

INTRODUCCIÓN

La langosta espinosa *Panulirus interruptus* pertenece al grupo de Crustáceos Decápodos de la familia Palinuridae (Latreille, 1803) y del género *Panulirus* (Gray, 1847). México cuenta con 7 especies de langostas espinosas, que habitan en aguas tropicales y subtropicales. Cuatro especies se encuentran en el Océano Pacífico (*P. interruptus*, *P. gracilis*, *P. inflatus* y *P. penicillatus*) y tres en el Golfo de México y Mar Caribe (*P. argus*, *P. guttatus* y *P. laevicauda*) (Bricnes & Lozano, 2000).

La langosta espinosa se encuentra entre los animales de mayor éxito, ya que puede dominar los mares por su tamaño, como por su abundancia. Son importantes en la cadena alimenticia, en parte porque se alimentan de animales pequeños, y además que son carroñeros. Son de hábitos nocturnos y durante el día permanece oculta en cuevas protegiéndose de sus depredadores (Gracia & Kensler, 1980).

La especie *Panulirus interruptus* también denominada langosta roja se distribuye del centro de California, EUA hasta Cabo San Lucas. Baja California Sur. Usualmente habita entre los 2 a los 30 m de profundidad y ocasionalmente se le encuentra hasta los 70 m (Gracia & Kensler, 1980).

La langosta se ha capturado en México desde 1929. Debido a su explotación no racional, en 1938 se estableció una temporada de veda de 6 meses, y se otorgó la exclusividad a las sociedades cooperativistas. Actualmente, operan 26 sociedades cooperativistas, divididas en las áreas costeras del país (Vega *et al.*, 1996).

En México, la producción de langosta se encuentra entre los recursos pesqueros más importantes y la mayor captura se lleva a cabo en Baja California Sur, aportando más del 75% de la producción total (SEPESCA,

1998). *Panulirus interruptus* ha llegado a contribuir hasta el 95% de la producción a lo largo de Baja California. En la última década la producción ha oscilado alrededor de 1 200 ton, alcanzando la temporada pasada (2000-2001) aproximadamente 1 600 ton. El 73% de la producción de la langosta se exporta como producto vivo o congelado (Ortiz, 1996) a EUA, Japón y la Comunidad Europea (SEPESCA, 2000).

Las langostas son transportadas a las cooperativas en camiones cerrados o abiertos, en costales, jabas, hieleras o apiladas sin agua. Una de las características importantes es que la langosta es muy resistente al manejo y después de ser sacada del agua mantiene unidos el cefalotórax y el abdomen (Gracia & Kensler, 1980). En las cooperativas las langostas se reintroducen en agua, generalmente a una temperatura de 13° a 18 °C, durante 1 o 5 días (Vega *et al.*, 1996). Estos métodos de transporte exponen a las langostas a condiciones estresantes como excesiva manipulación, largos periodos de emersión y de desecación, aumento de la actividad e interacción entre langostas por el hacinamiento, aumento de los niveles de los compuestos nitrogenados como resultado de la emersión, y bajos niveles del oxígeno disponible (Schwarz, 1995; Taylor *et al.*, 1997).

Existe una gran variabilidad de los métodos de captura, transporte y procesos de reinmersión durante la explotación y el manejo del recurso langostero de B.C.S. Para transportar langostas con una alta supervivencia se requiere establecer criterios para el reconocimiento del estrés y establecer procedimientos para revertirlos.

El oxígeno disuelto es un factor metabólico limitante ya que controla alguna de las reacciones bioquímicas del organismo. La cantidad de oxígeno que está a disposición de los organismos va a determinar la supervivencia, así como su distribución ecológica y el crecimiento y producción adecuada. En organismos marinos en general el consumo de oxígeno está influido por

diferentes factores ambientales como son salinidad, temperatura, época del año, intensidad luminosa y concentraciones de oxígeno disuelto en el agua; además, por factores intrínsecos del organismo como tamaño, estadio de muda, desarrollo gonadal, inanición, sexo y ritmos biológicos (Waterman, 1960).

Las langostas poseen branquias eficientes y mecanismos para generar un flujo continuo de agua a través de ellas. El agua es su principal recurso para obtener oxígeno del medio. El agua entra por la ventilación que se produce mediante los movimientos de natación normales con ayuda del escafnatito del segundo maxilar que funciona como remo para generar los flujos de corrientes de agua necesaria. Tales flujos complejos permiten extraer del agua un volumen máximo de oxígeno (Wilson, 1989).

La langosta roja puede ser expuesta por periodos prolongados a condiciones de hipoxia, durante su explotación y comercialización. Esto puede afectar severamente los procesos metabólicos y fisiológicos. Bajo tales condiciones, deben existir mecanismos compensatorios para mantener el suministro de energía que requieren los tejidos. Los ajustes respiratorios durante hipoxia incluyen generalmente alteraciones en la actividad cardioventilatoria y en la captación del oxígeno por la hemolinfa. La tasa regulatoria normalmente se incrementa para compensar la reducción en el oxígeno, pero la regulación del corazón usualmente es más variable, dependiendo de la especie y de las condiciones experimentales usadas, aunque no presenta efecto en algunas especies (Uglow, 1973; Coyer, 1976; deFur & Mangum, 1979; Hagerman, 1982; McMahon & Wilkes, 1983; Hagerman & Uglow, 1985; Taylor & Spicer, 1987).

Otro tipo de adaptación a la hipoxia, está relacionado con los mecanismos metabólicos usados en la producción energética. Durante hipoxia la obtención de energía puede darse parcialmente o totalmente usando vías anaeróbicas, dando por resultado concentraciones elevadas de la glucosa y del

lactato en la hemolinfa y la disminución en los carbohidratos totales (Baden *et al.*, 1994, citado en Schwarz, 1995). Recientemente, se ha demostrado que diversas especies de crustáceos acumulan grandes cantidades de lactato durante la anoxia o hipoxia prolongada (vgr. *Palaemonetes adspersus*; *Palaemonetes varians*) y son capaces de removerlo a tasas similares durante la recuperación (Nielsen & Hagerman, 1998)

ANTECEDENTES

Los primeros trabajos que se tienen para langosta en relación al consumo de oxígeno fue el de Paine (1965) y el de Ronder & Winget (1969). Estos trabajos presentan la información que relaciona la tasa metabólica con los mecanismos reguladores o conformadores del oxígeno y definen el punto crítico de oxígeno (Pc). Se ha demostrado que el Pc se incrementa con la temperatura en crustáceos, insectos, gasterópodos, anélidos, peces y estrellas de mar (Wiens & Armitage, 1961; Johansen & Peterson, 1971; Wigglesworth, 1972; Young, 1973; Cosgrove & Schwarz, 1965; Hoffman & Mangum 1970; Sander, 1973; Taylor et al., 1977; Newell *et al.*, 1978). Otras de las variables que afectan el Pc son la actividad (Teal & Cary, 1976; Wigglesworth, 1972; Taylor, 1976; Spook, 1974); el ciclo de muda (Thompson & Pritchard, 1969); la cantidad de pigmento respiratorio (Spook, 1974); la salinidad (Bayne, 1973; Sanders, 1973); el estrés por manejo (Bayne, 1971) y el ritmo circadiano (Sander, 1973).

La habilidad para soportar hipoxia varía interespecíficamente entre los crustáceos y las respuestas metabólicas y fisiológicas pueden estar relacionadas con el hábitat de las especies (Herreid, 1980). Eriksson & Baden (1996) señalan que los adultos de la langosta *Nephrops norvegicus* toleran mejor las condiciones de hipoxia que los juveniles y que la actividad general de las langostas se reduce significativamente durante hipoxia. Reiber & Mc Mahon (1998) indican que durante hipoxia progresiva el oxígeno se mantiene bombeando sangre a órganos vitales y disminuyendo el ritmo cardíaco y Schwarz (1995) señala que existen ajustes en la captación del oxígeno en hemolinfa.

Schwarz (1995) menciona que la exposición a hipoxia puede afectar severamente el metabolismo y los procesos fisiológicos de la langosta durante su comercialización y que las langostas pueden presentar mecanismos compensatorios para mantener el suministro de energía parcialmente o

totalmente usando vías anaeróbicas, dando por resultado concentraciones elevadas de la glucosa y del lactato en la hemolinfa y la disminución en los carbohidratos totales. La formación de lactato durante rutas anaerobias ha sido reportada en diversos crustáceos (Robertson, 1960; Taylor, Butler & Al Wassia, 1977; Stewart, Dingle & Odense, 1966; Spoek, 1974; Butler, Taylor & Mc Mahon, 1978). Taylor & Spicer (1987) observaron hiperglicemia en los camarones *Palaemon elegans* y *P. serratus* aún cuando la concentración de lactato era baja concluyendo que debe existir un periodo preparatorio en la que los animales al detectar condiciones de hipoxia movilizan las reservas de glucosa cuando aún no se requieren vías anaerobias para la obtención de energía.

JUSTIFICACIÓN

Las langostas espinosas soportan una de las más importantes pesquerías comerciales en el mundo, además de pequeñas pesquerías artesanales en algunos lugares donde no son muy abundantes. La langosta es capturada y comercializada en más de 90 países. La captura mundial anual es aproximadamente de 77,000 ton con un valor aproximado de \$500 millones de dólares (Phillips & Kittaka, 2000).

En México, los recursos pesqueros, especialmente aquellos que presentan un elevado valor en el mercado como el de la langosta roja, es importante no sólo por su volumen y valor económico, ya que es apreciada por su calidad nutricional y que el tamaño de la cola es mayor que el cefalotórax a diferencia de otras especies de langosta (Ayala *et al.*, 1988). En México la producción de la langosta en 1999 fue de 1,296 ton de las cuales 1,184 ton, fueron enviadas al mercado internacional, generando \$17.259 millones de dólares (SEPECSA, 2000). *Panulirus interruptus* sostiene la mayor producción nacional y se distribuye en mayor abundancia en Baja California Sur; este estado aporta el 75% de la producción total. *Panulirus interruptus* es resistente al transporte en vivo y se ha colocado en el mercado internacional como producto vivo (Díaz & Guzmán, 1995).

A pesar que B.C.S. sólo cuenta con una carretera de acceso en sus casi 900 km y que es difícil la llegada a los sitios de captura, la langosta roja genera importantes ingresos al estado. En presentación viva la langosta roja se ha logrado comercializar de \$15.0 a \$22.0 dólares/kg. En el mercado internacional, ha ido aumentando la importancia de la langosta viva y fresca, a diferencia de la langosta congelada, que ha disminuido el 16% en su venta desde 1990 (Vega *et al.*, 1996). Existen diversas investigaciones que evalúan distintos aspectos sobre la ecología y biología de langosta roja. Sin embargo, existe un vacío significativo en el conocimiento de la fisiología y de las adaptaciones de estos

organismos cuando son transportados vivos con fines de mercado. Por esta razón es importante evaluar la capacidad fisiológica y el desempeño de la langosta roja, cuando es sometida a hipoxia progresiva.

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad fisiológica y el desempeño de la langosta roja, *Panulirus interruptus*, cuando es sometida a hipoxia progresiva.

Particulares

Determinar el consumo de oxígeno de la langosta roja, *P. interruptus*, durante hipoxia progresiva a dos diferentes temperaturas.

Establecer el punto crítico de oxígeno (P_c) de la langosta roja, *P. interruptus*, a estas dos temperaturas.

Determinar la variación en los principales combustibles metabólicos en la región pericárdica y del pereiópodo durante normoxia, hipoxia y P_c a dos temperaturas en la langosta roja, *P. interruptus*.

HIPÓTESIS

H₀: No existen diferencias significativas en el metabolismo respiratorio y en los combustibles metabólicos de la langosta roja, *Panulirus interruptus*, cuando es sometida a variaciones en la temperatura y en el oxígeno disponible.

H_a: Si existen variaciones en el metabolismo respiratorio y en los combustibles metabólicos de la langosta roja, *Panulirus interruptus*, cuando es sometida a variaciones en la temperatura y en el oxígeno disponible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de los organismos experimentales

Se compraron 50 langostas rojas, *Panulirus interruptus*, de aproximadamente 600 g de peso, de ambos sexos, de talla comercial que fueron capturadas en el complejo lagunar Bahía Magdalena-Almejas se localiza en Baja California Sur, entre lo 24° 15' y 25° 20' y los 111° 30' y 112° 12' y tiene una superficie total de 1, 390 km² y fueron transportadas vivas a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).

Mantenimiento de los organismos experimentales

Las langostas permanecieron en una tina ovalada de fibra de vidrio de 1, 000 L por dos semanas, en un sistema de recirculación, integrado por dos unidades de 100 L para la biofiltración del agua. La salinidad permaneció a 37‰ y se mantuvo con una saturación de oxígeno superior al 80%. Para simular condiciones de su hábitat, se colocaron escondrijos. Diariamente se realizó un recambio de agua del 50%, y se retiró el alimento no consumido. Las langostas se alimentaron con calamar picado *ad libitum* una vez al día. Los escondrijos se limpiaron una vez por semana.

Temperaturas experimentales

Después de dos semanas de acondicionamiento, las langostas se aclimataron por 24 h a la temperatura experimental. Se seleccionaron dos temperaturas experimentales: 1) Temperatura 1 ($T_1 = 20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$) que se encuentra en el intervalo de temperatura del agua registrada a la mitad de la temporada de captura y 2) Temperatura 2 ($T_2 = 27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$) que se encuentra en el intervalo de temperatura del agua registrada al inicio de la temporada de captura (Vargas, 1999). T_1 se mantuvo con ayuda de un aire acondicionado mientras que para T_2 se utilizaron calentadores sumergibles de 50 watts.

Sistema de Respirometría

Se utilizó un sistema de respirometría, que consistió en una serie de 5 tinajas de plástico rectangulares (respirómetros) de 4 gal de capacidad. A cada respirómetro se le colocó una piedra aereadora de acuario de 10 cm y se llenó con agua de mar a 35‰ filtrada (1μ), clorada por 24 h y neutralizada con tiosulfato de sodio. El volumen de cada respirómetro se mantuvo constante a 15.5 L.

Mediciones de consumo de oxígeno

Las langostas fueron aclimatadas al sistema de respirometría por 24 h. Se realizó un recambio del 100% de agua de mar, antes de cortar el suministro de aire y permitir que las langostas consumieran el oxígeno de manera progresiva hasta alcanzar condiciones de hipoxia.

El consumo de oxígeno fue registrado cada 10 min durante el experimento con ayuda de un oxímetro (YSI-59) con electródo polarográfico. Una vez que no se registraron cambios en el consumo de oxígeno, el suministro de aire fue reestablecido y el agua completamente reemplazada. Las langostas permanecieron en el sistema de respirometría por tres días, para recuperación. Las mediciones del consumo de oxígeno se realizaron a la misma hora durante dicho periodo. Al final del experimento las langostas se pesaron en una balanza digital (Acculab VI) y se registró sexo. Un respirómetro sin langosta sirvió como blanco para estimar las posibles variaciones debido a microorganismos y otros factores que pudieran alterar los registros de oxígeno. Las evaluaciones del consumo de oxígeno fueron realizadas en 8 langostas.

El metabolismo respiratorio se estimó en base a la pendiente (velocidad de consumo) de la regresión lineal entre el tiempo y la disminución de oxígeno disuelto, después de haber sido ajustada considerando el volumen de agua del respirómetro y el peso de la langosta.

Toma de muestra de hemolinfa

Se tomaron muestras de hemolinfa de la región pericárdica y en la base del tercer pereiópodo con jeringas hipodérmicas de 3 ml previamente bañadas y llenadas con 200 μ l de solución isotónica para crustáceos (SIC) c/oxalato al 5% como anticoagulante, y se separaron en tubos para microcentrífuga de 1.75 ml. Las muestras de hemolinfa fueron centrifugadas (3 600 rpm, 5°C, 10 min) y separadas en submuestras para el análisis de los principales combustibles metabólicos: proteínas, carbohidratos, glucosa y lactato de acuerdo a las técnicas propuestas por Carreño (2000) y estandarizadas para langosta en el laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR.

Las proteínas fueron determinadas por la técnica de Bradford (Bradford, 1976), con un Kit comercial (Sigma, No Cat. B6916). Dicha técnica está basada en que los grupos amonio reaccionan, con el colorante azul cromassie, ácido fosfórico y metanol. El compuesto colorido formado por la reacción es directamente proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

Para los carbohidratos se utilizó el método de Antrona (Van Anandel, 1965), con el reactivo Anthrone (Sigma, No. Cat. A1631). La hemolinfa (150 μ l) se hace reaccionar con la solución de Antrona al 0.1%, en baño María a temperatura de 80 a 90 °C por 15 a 20 minutos. La reacción es directamente proporcional a la concentración de carbohidratos totales presente en la muestra, y se lee en un espectrofotómetro a 620 nm.

Para la glucosa se utilizó un Kit comercial (Merk, No Cat. 740393, método GOD-PAP, que consiste en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa, con la liberación de peróxido de hidrógeno. Este reacciona con fenol y 4-amino fenazona en presencia de una peroxidasa, dando un colorante rojo violeta de antipirilquinonimina, que es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

Para el lactato, se utilizó un Kit comercial (Sigma, método 735), con el cual el ácido láctico es convertido a piruvato con formación de peróxido de hidrógeno por lactato oxidasa, el cual es oxidado por una peroxidasa formando un compuesto colorido, el cual es directamente proporcional a la concentración de lactato.

Análisis estadístico

Para la estimación del punto crítico de oxígeno se utilizaron ecuaciones de regresión lineal, por arriba y por debajo del punto estimado de cambio (oxígeno-independencia a oxígeno-dependencia). La intersección de ambas rectas fue considerado como el mejor estimador del punto crítico.

A los datos obtenidos se les aplicaron pruebas de homocedasticidad. Las diferencias entre los tratamientos fueron establecidas mediante análisis de varianza (Statistica, Windows) (Sokal & Rohlf, 1984), y la prueba a posteriori de Tukey con un nivel de significancia de 0.05 para establecer los grupos homogéneos.

RESULTADOS

Metabolismo Respiratorio

En las figuras 1 y 2 se presentan el consumo de oxígeno de la langosta roja, *Panulirus interruptus*, durante hipoxia progresiva a 20 y 27 °C. El mayor consumo de oxígeno se presentó a 27 °C. El Pc a 20 °C se encuentra a 1.77 mg/L y a 27 °C se encontró a 2.66 mg/L. La supervivencia a 20 °C fue 80% y a 27 °C fue 70% después de finalizar el experimento.

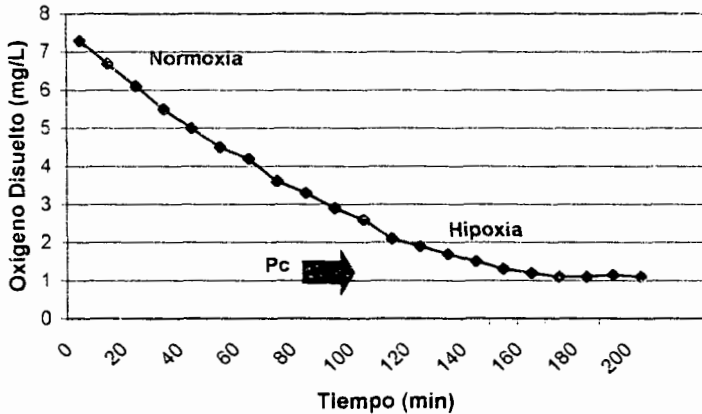


Figura 1. Ejemplo del consumo de oxígeno de *P. interruptus* durante hipoxia progresiva a 20 °C. Se señala el consumo durante normoxia e hipoxia y se indica el punto crítico de oxígeno (Pc).

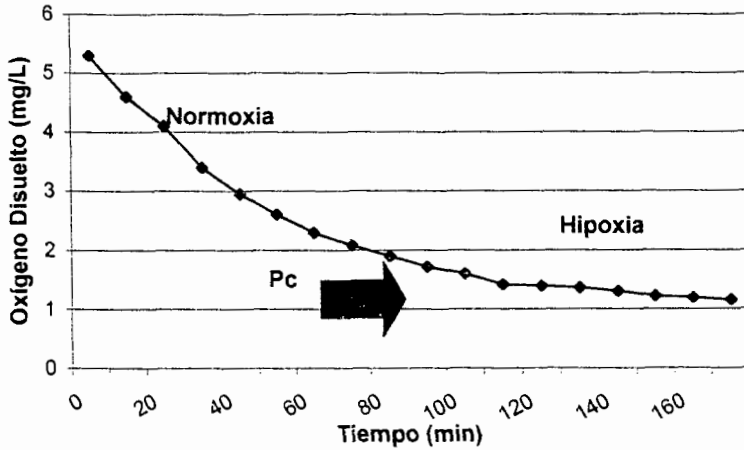


Figura 2. Ejemplo del consumo de oxígeno de *P. interruptus* durante hipoxia progresiva a 27 °C. Se señala el consumo durante normoxia e hipoxia y se indica el punto crítico de oxígeno (Pc).

En la tabla 1 se presentan las ecuaciones del consumo de oxígeno de las langostas durante normoxia e hipoxia y el Pc a las dos temperaturas experimentales. El consumo de oxígeno en normoxia fue constante e independiente del oxígeno disuelto hasta 1.77 mg/L a 20 °C mientras que a 27 °C hasta 2.66 mg/L. La temperatura tiene un efecto significativo ($P < 0.05$) en el Pc. El consumo durante hipoxia es aproximadamente el 10% del consumo durante normoxia.

Tabla 1. Ecuaciones utilizadas para la estimación del punto crítico durante normoxia e hipoxia en *P. interruptus* a 20 y 27 °C.

Temperatura (°C)	Ecuación durante Normoxia	Ecuación durante Hipoxia	Pc (mg/L)	Peso (g)	N
20	$Y = 7.07 - 0.0342x$	$y = 3.12 - 0.0103x$	1.77 ±0.07	557 ±105	7
27	$Y = 5.15 - 0.0600x$	$Y = 2.58 - 0.0113x$	2.66 ±0.60	513 ±72	8

Combustibles Metabólicos

En las tablas 2 y 3 se presentan la variación en los principales combustibles metabólicos en *Panulirus interruptus*. No existió diferencia significativa entre el sitio de toma de hemolinfa y la temperatura ($P > 0.05$) en los combustibles metabólicos, sin embargo existe un efecto significativo debido a la condición de oxígeno ($P < 0.05$).

Tabla 2 Combustibles metabólicos lactato, glucosa, carbohidratos (CHOS) y proteínas (media y desviación estándar) durante normoxia, hipoxia y Pc en pereiópodo y región del pericardio en *P. interruptus* a 20 °C.

Tratamiento	Lactato (mg/ml)	Glucosa (mg/ml)	CHOS (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	N
Normoxia, pereiópodo	0.0201	0.1008	0.1450	95.06	4
	±0.020	±0.031	±0.031	±23.97	
Normoxia, corazón	0.0067	0.1096	0.1815	119.99	4
	±0.003	±0.043	±0.053	±21.08	
Pc., pereiópodo	0.0570	0.0960	0.3851	88.58	7
	±0.045	±0.047	±0.212	±20.28	
Pc, corazón	0.0542	0.1780	0.3472	98.83	7
	±0.051	±0.147	±0.218	±13.04	
Hipoxia, pereiópodo	0.2580	0.2687	1.1164	84.97	7
	±0.168	±0.216	±1.247	±16.55	
Hipoxia, corazón	0.2913	0.2520	0.6327	80.78	7
	±0.157	±0.178	±0.419	±29.32	

Tabla 3. Combustibles metabólicos lactato, glucosa, carbohidratos (CHOS) y proteínas (media y desviación estándar) durante normoxia, hipoxia y Pc en pereiópodo y región pericárdica en *P. interruptus* a 27 °C.

Tratamiento	Lactato (mg/ml)	Glucosa (mg/ml)	CHOS (mg/ml)	Proteína (mg/ml)	N
Normoxia, pereiópodo	0.0247 ± 0.046	0.1327 ± 0.060	0.2451 ± 0.1100	114.17 ± 33.71	8
Normoxia, corazón	0.0227 ± 0.013	0.1757 ± 0.094	0.2677 ± 0.129	130.30 ± 32.75	8
Pc, pereiópodo	0.1414 ± 0.097	0.2630 ± 0.166	0.5432 ± 0.199	105.62 ± 39.92	5
Pc, corazón	0.0707 ± 0.043	0.3310 ± 0.277	0.5336 ± 0.270	82.99 ± 47.26	5
Hipoxia, pereiópodo	0.2927 ± 0.124	0.32910 ± 0.166	0.8789 ± 0.463	96.63 ± 35.79	8
Hipoxia, corazón	0.2764 ± 0.132	0.2856 ± 0.142	0.8047 ± 0.346	84.76 ± 41.22	8

El lactato varió de 0.0067 a 0.2919 (mg/ml) a 20 °C y de 0.0227 a 0.2927 (mg/ml) a 27 °C y aumentó significativamente durante hipoxia ($P < 0.05$), sin embargo no existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la temperatura y el sitio de toma de hemolinfa (Figura 3). El lactato durante hipoxia es aproximadamente 10 veces más alto que durante normoxia a 27 °C mientras que a 20 °C el lactato es aproximadamente 20 veces más alto.

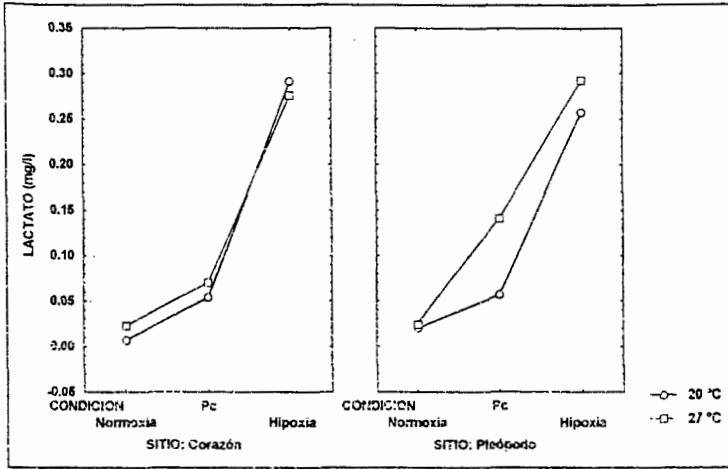


Figura 3. Efecto de la temperatura, sitio y condición de oxígeno en la concentración de lactato en *P. interruptus*.

La glucosa varió de 0.0960 a 0.2687 (mg/ml) a 20 °C y de 0.1327 a 0.3310 (mg/ml) a 27 °C y aumentó significativamente por efecto de la temperatura ($P < 0.05$). No se encontró un efecto significativo debido a la condición de oxígeno ni al sitio de toma de hemolinfa ($P > 0.05$) (Figura 4). La glucosa a 27 °C es aproximadamente 225% más alta que a 20 °C.

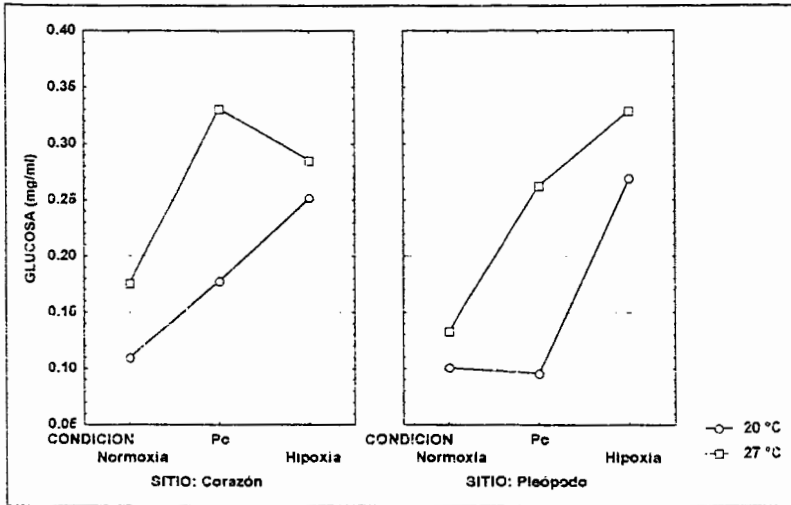


Figura 4. Efecto de la temperatura, sitio y condición de oxígeno en la concentración de glucosa en *P. interruptus*

Los carbohidratos variaron de 0.1450 a 1.1164 (mg/ml) a 20 °C y de 0.2451 a 0.8790 (mg/ml) a 27 °C y aumentaron significativamente durante hipoxia ($P < 0.05$). Sin embargo no existió diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la temperatura y el sitio de toma de hemolinfa, como se muestra en la Figura 5. Los carbohidratos durante hipoxia son aproximadamente 4.3 veces más altos que durante normoxia a 20 °C mientras que a 27 °C los carbohidratos son aproximadamente 2.3 veces más altos.

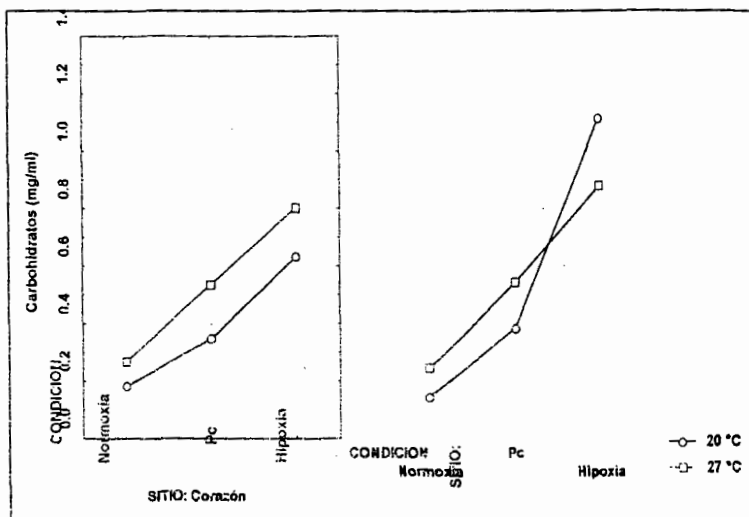


Figura 5. Efecto de la temperatura, sitio y condición de oxígeno en la concentración de carbohidratos en *P. interruptus*

Las proteínas variaron de 80.78 a 119.99 (mg/ml) a 20 °C y de 82.99 a 130.30 (mg/ml) a 27 °C. La tendencia fue a disminuir las proteínas por efecto de la condición de oxígeno, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la temperatura, el sitio de toma de hemolinfa y la condición de oxígeno, como se muestra en la Figura 6.

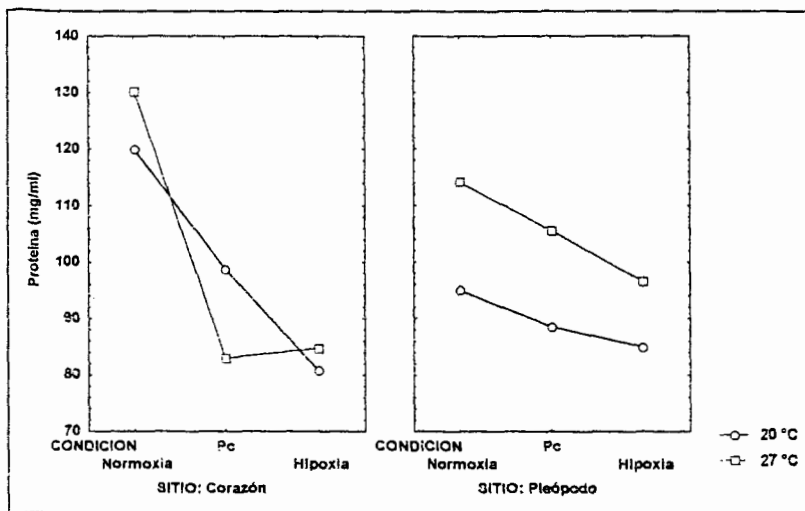


Figura 6. Efecto de la temperatura, sitio y condición de oxígeno en la concentraciones de la proteínas en *P. interruptus*

DISCUSIÓN

Las langostas y otros crustáceos poseen diversas habilidades para enfrentar situaciones de hipoxia y/o anoxia que en general están relacionadas con el hábitat y varían con las respuestas metabólicas y fisiológicas de manera específica. Las langostas pueden ser oxígeno-reguladoras hasta un nivel o punto que ha sido denominado el punto crítico de oxígeno, P_c , por debajo del cual se vuelven oxígeno-conformadores o dependientes del nivel de oxígeno. El P_c ha sido tomado como el principio de nivel límite de oxígeno para la especie. Es común encontrar en la literatura que la interpretación de conformación o regulación ha llevado a graves confusiones y errores. Sin embargo el P_c ha sido reportado de manera consistente entre 2.0 y 0.9 mg/L para una gama de crustáceos (Egusa, 1961., Mackay, 1974., Kramer, 1975., Liao and Huang, 1975., Armitage and Wall, 1982., Llobrera, 1983., Troughot and Jouve-Duhamel, 1983., Liao and Murai, 1986., Rosas *et al.*, 1997, Ocampo, 2001). En el presente trabajo el P_c se encontró a 1.7 mg/L a 20 °C mientras que a 27 °C se encontró a 2.6 mg/L, lo que podría indicar que la langosta roja tiene menor capacidad de soportar condiciones de hipoxia a temperaturas altas. A 27 °C se registraron 3 muertes durante el experimento o hasta 48 h después ser regresadas a condiciones de normoxia. Mientras que a 20 °C se registraron solamente 2 muertes. Se pudo observar que conforme se alcanzaban niveles de hipoxia las langostas mostraban signos que han sido reportados por otros autores para langostas ante situaciones de estrés por hipoxia (Eriksson & Baden, 1997; Taylor & Spicer, 1987) tales como intento de langostas por salir del respirómetro, colocarse sobre un costado, y signos de debilitamiento lo cual fue más evidente a 27 °C.

La capacidad oxígeno-reguladora tiende a disminuir con incrementos en la temperatura (Villarreal *et al.*, 1994). Las ecuaciones de consumo de oxígeno que se muestran en la tabla 1. indican que el consumo de oxígeno es diferente a 20 °C con relación a 27 °C, por lo cual podemos decir que el metabolismo de

la langosta roja es afectado por la temperatura. Estas observaciones son similares a las reportadas por Herreid (1980) para una variedad de especies acuáticas.

Los crustáceos decápodos expuestos a condiciones de hipoxia en el agua pueden mantener su metabolismo aerobio por una variedad de mecanismos fisiológicos (Mc Mahon & Wilkens, 1975). Sin embargo cuando regresan a condiciones de normoxia presentan una deuda de oxígeno que puede reflejarse en un marcado incremento en el consumo de oxígeno. Algunas especies de langostas como *Homarus vulgaris* han demostrado tener la capacidad de adaptarse a la hipoxia mejorando la eficiencia de la transferencia del oxígeno a través de las branquias (Butler *et al.*, 1978). Reiber & Mc Mahon (1998) sugieren que el suministro de oxígeno puede ser mantenido bombeando sangre exclusivamente a órganos vitales y disminuyendo el ritmo cardíaco y la actividad.

En nuestros resultados con *Panulirus interruptus* se pudo observar que conforme se alcanzaban condiciones de hipoxia, la actividad de las langostas se reducía, podría pensarse que en algunos casos las langostas estaban en estado letárgico. Esta conducta también fue observada en juveniles de langosta bajo condiciones de hipoxia por Hagerman & Uglow (1985) y Eriksson & Baden (1996). Estas repuestas podrían ser consideradas como mecanismos compensatorios para mantener el suministro de energía que se requiere para poder subsistir ante una situación de estrés y/o condición desfavorable, y pudieran ser utilizados por *P. interruptus* para mantener su homeostasis durante hipoxia progresiva.

Por otro lado, se ha demostrado que los crustáceos expuestos a condiciones de hipoxia pueden utilizar vías anaerobias para cubrir la demanda de oxígeno, siendo el L-lactato el principal metabolito final de decápodos. Se ha pensado que el lactato puede funcionar como un modulador fisiológico para

incrementar la afinidad por oxígeno en la hemolinfa de langostas hipóxicas (Bouchet & Trouchet, 1984). Shwarz (1995) ha demostrado ajustes en la captación del oxígeno en hemolinfa en la langosta *Nephrops norvegicus*. En *P. interruptus* encontramos que el lactato se incrementa de manera significativa durante hipoxia y aunque la tendencia fue a incrementarse con incrementos en la temperatura no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) por efecto de la temperatura. Esto sugiere que *P. interruptus* podría seguir la estrategia sugerida por Bouchet & Trouhot (1984) y Sharwz (1995) por lo que en el futuro deberá evaluarse si el lactato podría actuar como un modulador fisiológico en *P. interruptus*.

Taylor & Spicer (1987) indican que algunas especies de camarón tiene la capacidad de detectar condiciones de hipoxia moviendo las reservas de glucosa aún cuando no se utilizan vías anaerobeas para la obtención de energía. Zou, et al.,(1996) sugieren que estas respuestas pueden funcionar como una preparación fisiológica para las demandas de sustrato durante fermentación. Taylor et al.,(1997) señalan que los cambios en los niveles de glucosa se deben a las respuestas fisiológicas para regular condiciones de estrés, procesos de osmorregulación, hipoxia y actividad locomotora.

Taylor & Spicer (1987) y Zou et al., (1996) encontraron que la glucosa aumenta significativamente durante hipoxia en *Palaemon elegans*, *P. serratus* y *E. sinensis*. Estos incrementos van del 5% al 100% con respecto a los valores registrados durante normoxia. En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en el nivel de glucosa durante hipoxia y los valores encontrados son inferiores a los reportados por Taylor & Spicer (1987) y Zou et al., (1996). La temperatura tuvo un efecto significativo en la glucosa ya que a 27 °C es aproximadamente 2.3 veces más alta que a 20 °C. Los medios y vías por los que los organismos distribuyen y almacenan la energía son complejos y están afectados por una serie de factores o combinación de factores endógenos y exógenos. Los crustáceos utilizan proteínas como principal fuente para la

obtención de la energía (Blaxter, 1989). La tendencia que se encontraron en la disminución de las proteínas con el incremento en los carbohidratos podría estar relacionado con una hiperglicemia durante hipoxia.

CONCLUSION

La capacidad oxígeno-reguladora oxígeno-conformadora de la langosta roja, *Panulirus interruptus* es afectada por la temperatura.

Los cambios internos que se presentan durante hipoxia progresiva indican que la langosta roja intenta cubrir su deuda en oxígeno produciendo lactato, disminuyendo su actividad y su ritmo cardíaco.

La hemolinfa de langosta roja puede ser utilizada como un buen indicador del estado interno del animal

GLOSARIO

Anoxia: condiciones carentes de oxígeno.

Hipoxia: condiciones muy bajas de oxígeno, por debajo del 30% de saturación de oxígeno.

Normoxia: condiciones normales de oxígeno, cercanas a saturación de oxígeno.

Oxígeno-regulador: cuando el consumo de oxígeno es independiente de la concentración en el medio.

Oxígeno-conformador: cuando el consumo de oxígeno es dependiente de los niveles de oxígeno disponible.

Pc: es el punto de cambio en el que un organismo oxígeno-conformador pasa a ser oxígeno-regulador. Marca el principio del nivel letal de oxígeno para la especie.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala, M. Y., González, J. G y Espinosa, G. 1988. Biología y pesca en el Pacífico Mexicano. Los recursos pesqueros masivos de México. Secretaría de pesca. Instituto Nacional de pesca XXV aniversario. 251 – 286 pp.
2. Blaxter, K.L. 1989. Energy metabolism in animals and man. Cambridge University Press, New York U.S.A. 336 pp.
3. Bouchet, J. Y., Truchot, J. P., 1984. Effects of hypoxia and L-Lactate on the Haemocyanin – oxygen affinity of the Lobster, *Homarus vulgaris*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 80 A, No. 1, pp. 69 – 73.
4. Bradford, M.M. 1976. A refined method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-253.
5. Bridges, C. R., Brand, A. R. 1979. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood Lactate levels of some Marine Crustacea. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 65 A, No. pp. 399 – 409.
6. Briones, F. P., Lozano, A. E. 2000. The Spiny Lobster Fisheries in México. In Spiny Lobsters: Fisheries and Culture. Edited by Philips, B. F., Kitakka, J. 2000. Second Edition. Fishing News Books. London. 673 pp.
7. Carreño, D. 2000. Alteraciones metabólicas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en respuesta a la manipulación rutinaria bajo condiciones de cultivo y a la ablación del tallo ocular. Tesis de Maestría. CICIMAR, IPN. 113 pp.
8. Herreid II, C.F.. 1980. Hypoxia in Invertebrate. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 67 A, No. pp. 311 – 320.
9. Díaz, M. A. y S. P. Guzmán, 1995. Hábitos alimentarios de la langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall, 1840), en Bahía Tortugas, Baja California Sur. Ciencias Marinas 21 (4): 439 – 462

10. Eriksson, S. P., Baden, S. P. 1997. Behaviour and tolerance to hypoxia in juvenile Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) of different ages. *Marine Biology* 128: 49 – 54 .
11. Gracia, A., Kensler, C.B., 1980. las langostas de México: su biología y pesquería. Centro de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México 7 (2): 111 – 128.
12. Mc Mahon, B. Wilkens, J. 1975. Respiratory and circulatory response to hypoxia in the lobster *homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 62, 637-655.
13. Nielsen, A., Hagerman, L. 1998. Effects of short-term hypoxia on metabolism and haemocyanin oxygen transport in the prawns *Palaemon adspersus* and *Palaemonetes varians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 167 0), 177-183.
14. Ocampo, L. 2001. Critical oxygen point in yellowleg shrimp, *Farfantepenaeus californensis* a potencial species for the live trade. Marketing and shipping Live Aquatic Products. Paust, B.C. & Rice, A.A (eds). University of Alaska Sea Grant. 23-26.
15. Ortiz, D. V. 1996. Adaptaciones fisiológicas de la "langosta roja" *Panulirus interruptus* para sobrevivir fuera del agua en relación al tiempo y temperatura de exposición aérea. Universidad Autónoma de Baja California Facultad de Ciencias Marinas (UABC) (Ed.), Ensenada, México, 51 p.
16. Phillips, B. F. And J. Kittaka, 2000. Spiny lobsters: Fisheries and culture, 2ª ed. Blackwell Science, Great Britain, 169 - 188.
17. Reiber. C. L., McMahon. B. R., 1998. The effects of progressive Hypoxia on the crustacean cardiovascular system: a comparison of the freshwater crayfish, (*Procambarus clarkii*), and the lobster (*Homarus americanus*). *J Comp Physiol B* 168:168 – 176.
18. Roder., R. Winget., 1969. Oxygen consumption and respiratory energetics in the spiny lobster, *Panulirus interruptus* (Randall). Reference: *Biol. Bull.*, 136:301 - 312

19. Schwarz, A. 1995. Aspects of the physiology of some crustacean species with particular reference to their live marketing. PhD. Thesis. University of Hull. 50 – 57 pp.
20. SEPESCA 1996. Anuario Estadístico de Pesca 1997. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (Ed.), B.C., México, 239 p.
21. SEPESCA 2000. Anuario Estadístico de Pesca 1999. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (Ed.), B.C., México, 224 p.
22. Sokal, R. R. y F. J. Rohlf, 1984. Biometry. Freeman & Co.(Ed.), San Francisco, USA, 776 p.
23. Taylor y J. L Spicer. 1987. metabolic responses of prawns *Palaemon elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. Marine Biology 95, 521 – 530.
24. Taylor, H., B.D. Paterson, R. Wong y R. Wells. 1997. Physiology and live transport of lobsters : report from a workshop. Mar. Freshwater Res. 48, 817-822
25. Vargas, G. M. 1999. Estudio comparativo de fecundidad de la langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) entre zonas oceánicas y costeras de la plataforma centro occidental de Baja California Sur, durante 1992. Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) (Ed.), La Paz, México, 41 p.
26. Vega , A. V., G. C. Espinoza y C. R Gómez, 1996. Pesquería de langosta *Panulirus* spp. En: Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. Casas, M. V. y G. D. Ponce, (Editores), SEMARNAP, UABCS, Gobierno del Estado de B.C.S., Instituto Nacional de Pesca, FAO, CIBNOR, CICIMAR (Ed.), B.C.S., México, 227 – 261 pp.
27. Vega, A. V., G. C. Espinoza y C. R Gómez, 2000. Pesquería de langosta *Panulirus* spp. En: Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur, Casas, M. V. y G. D. Ponce, (Editores), SEMARNAP, UABCS, Gobierno del Estado de B.C.S., Instituto Nacional de Pesca, FAO, CIBNOR, CICIMAR (Ed.), B.C.S., México, 227 – 261 pp.

28. Van Andel, E. 1965. Estimación of glycogen in Small amounts of tissue, *Anality biochemica*, 11: 256 - 265
29. Waterman, T.H. 1960. The Physiology of Crustacea. Vol 1. Academic Press, New York.
30. Wilson, J. A. 1989. Fundamentos de Fisiología Animal. Noriega (Ed.), D.F., México, 118, 440 – 456 pp.
31. Zou, E., Du, N., Lai, W., 1996. The Effects of Severe Hypoxia on Lactate and Glucosa Concentration in the Blood of the Chinese Freshwater Crab *Eriopcheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 114 A, No.2, pp. 105 – 109.

CARBOHIDRATOS

Se utilizó el método de Anthrona (Van Handel, 1965) con el reactivo Anthrone (Sigma, Cat. No. A 1631). La hemolinfa (150 μ l) se hace reaccionar con una solución de Anthrona al 0.1 % en baño María a temperatura de 80 a 90°C por 15 a 20 minutos. La reacción es directamente proporcional a la concentración de carbohidratos totales presentes en la muestra y se lee la absorbancia a 260 nm.

Se elabora una curva tipo con una solución estándar de glucosa de 2 mg/ml, con la siguientes concentraciones: 0.5, 0.25, 0.125 y 0.065 mg/ml.

ANEXO I**GLUCOSA**

Se utilizó el kit de Diagnostica Merck (método GOD-PAP, Cat. No. 740393), que consiste en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa, con la liberación del peróxido de hidrógeno. Este reacciona con fenol y 4 amino-fenazona en presencia de una peroxidasa, dando un colorante rojo violeta de antipirilquinonimina, que es proporcional a la cantidad de glucosa presente de la muestra.

Para determinación del plasma, se tomaran 20 μ l y se hace reaccionar con 200 μ l de la solución reactiva por un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se mide su absorbancia a 492 nm. Se elabora una curva tipo con una solución estándar, cuya concentración es de 100 mg/dl (5.55 mmol/L), con las siguientes concentraciones: 100, 50, 25 y 12.5 mg/dl. Como blanco se utiliza solución isotónica de crustáceos (SIC).

LACTATO

Se utilizó un kit Sigma. (No. de método 735), con el cual el ácido láctico es convertido en piruvato con formación de peróxido de hidrógeno por lactato oxidasa, el cual es oxidado por una peroxidasa formando un compuesto colorido, el cual es directamente proporcional a la concentración de lactato en la muestra.

Para su determinación en plasma, se toma 20 μ l de la muestra, y se hace reaccionar con 200 μ l de la solución reactiva por un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mide su absorbancia a 560 nm. Se elabora una curva tipo con una solución estándar, cuya concentración es de 40 mg/dl, como las siguientes concentraciones: 40, 20, 10 y 5 mg/dl como blanco se utiliza SIC.

PROTEINAS

Se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976), en la cual los grupos aminos reaccionan con el colorante azul de cromassie, ácido fosforico y metanol. El compuesto colorido formado por la reacción es directamente proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

Para su determinación en plasma, se toma 5 μ l de la muestra y se diluye en 495 μ l de SIC (dil. 1: 100). De estas diluciones, se toma 10 μ l y se hace reaccionar con 200 μ l de la solución reactiva (Bradford). Posteriormente se mide su absorbancia a 560 nm. Se elabora la curva tipo con la solución estándar (albúmina bovina), cuya concentración es de 2 mg/ml, con las siguientes concentraciones: 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ml. Como blanco se utiliza SIC.
