



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Estudio comparado del grado de oxidependencia en animales intermareales

Alumno: Gontzal Merchán De la Cruz

Director: Enrique Navarro Adorno

Leioa, Junio 2015



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ÍNDICE

ABSTRACT.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Modelos y grado de oxidependencia.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Selección y mantenimiento de los animales.....	8
Diseño experimental.....	8
Procedimiento.....	9
Tratamiento de datos.....	10
VO ₂ vs peso.....	10
Grado de oxidependencia.....	11
VO ₂ vs [O ₂].....	11
RESULTADOS.....	12
[O ₂] medio vs tiempo.....	12
VO ₂ vs peso.....	14
Grado de oxidependencia.....	15
VO ₂ vs [O ₂].....	17
DISCUSIÓN.....	19
BIBLIOGRAFIA.....	21

ABSTRACT

One of the limiting factors of animal life in the intertidal zone is the availability of oxygen. In the present study we have developed an index to measure the degree of oxidependence that has been applied to the respiratory behavior of different sizes copies intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus*, in order to make an approach to the relationship between the oxygen concentration of the habitat and the rate of oxygen consumption on the one hand, and between it and the size of the copies, on the other. The relationship between the rate of oxygen consumption (VO_2) and the weight of the specimens of *P. marmoratus* fits a potential function. The value of b (mass exponent) shows that there is negative allometry ($b < 1$) between the rate of oxygen consumption and weight of the specimens, which Kleiber's law is fulfilled: metabolic weight- specific rate increases with decreasing size of the animals. With regard to oxidependence index, we see that the differences are not significant between medium and large specimens but they are significant between the large-medium and small specimens. Oxidependence grades on samples of large and medium *P. marmoratus* are greater than in the small samples. That is, during hypoxia, the smallest specimens of *P. marmoratus* have greater ability to control the rate of oxygen consumption (they are more "oxiregulators"), than the largest specimens (more "oxiconcordant"). It can therefore be concluded that size is a variable to take into account to show the differences in the index of oxidependence of intertidal animals, but the results may be different depending on other exogenous variables, such as temperature or salinity.

RESUMEN

Uno de los factores limitantes de la vida animal en la zona intermareal es la disponibilidad de oxígeno. En el presente estudio se ha desarrollado un índice para medir el grado de oxidependencia que ha sido aplicado al comportamiento respiratorio para ejemplares de diferentes tamaños del cangrejo intermareal *Pachygrapsus marmoratus*, con objeto de realizar una aproximación a la relación existente entre la concentración de oxígeno del medio y la tasa de consumo de oxígeno, por una parte, y de ésta con el tamaño de los ejemplares, por otra. La relación entre la tasa de consumo de oxígeno (VO_2) y el peso de los ejemplares de *P. marmoratus* se ajusta a una función potencial. Del valor de b (exponente de la masa) se desprende que existe alometría negativa ($b < 1$) entre la tasa de consumo de oxígeno y el peso de los ejemplares, con lo que se cumple la ley de Kleiber: la tasa metabólica peso-específica se incrementa al reducirse el tamaño de los animales. Con respecto al índice de oxidependencia, se observa que las diferencias no son significativas entre los ejemplares grandes y los medianos pero sí lo son entre los ejemplares grandes-medianos y los pequeños. Los grados de oxidependencia en los ejemplares de *P. marmoratus* grandes y medianos son mayores que en los pequeños. Es decir, en el curso de la hipoxia, los ejemplares más pequeños de *P. marmoratus* tienen una mayor capacidad de regulación de la tasa de consumo de oxígeno (son más “oxirreguladores”), que los ejemplares de mayor tamaño (más “oxiconcordantes”). Se puede concluir pues que el tamaño es una variable a tener en cuenta para las diferencias en el grado de oxidependencia de los animales intermareales, pero sus resultados pueden ser diferentes dependiendo de otro tipo de variables exógenas, como la temperatura o la salinidad.

INTRODUCCIÓN

El ambiente intermareal es, sin duda, uno de los ambientes más hostiles que existen debido a las duras condiciones abióticas que tienen que soportar los organismos que viven en él. Normalmente la zona intermareal se extiende entre el nivel de la pleamar y la bajamar, de manera que el ciclo de mareas afecta a las condiciones climáticas provocando cambios bruscos físicos, químicos y biológicos en toda su extensión (Gonzalez Ruano, 2009). Se pueden distinguir 2 tipos de ambientes intermareales: El intermareal rocoso y el intermareal arenoso, los cuáles se diferencian mayormente por el tipo de sustrato que predomina en ellos, en el intermareal rocoso el sustrato que predomina es de mayor diámetro (rocas de gran tamaño) mientras que en el intermareal arenoso predomina un sustrato de menor diámetro (arena).

Dentro de los organismos animales que se pueden encontrar en el ambiente intermareal rocoso destacan sobre todo los crustáceos, los cuales resultan muy útiles para realizar estudios en relación a su metabolismo, ya que particularmente los decápodos (cangrejos), se mantienen activos bajo condiciones ambientales extremas en muchas ocasiones. En concreto, los cangrejos intermareales tienen que poseer energía suficiente para llevar a cabo su actividad tanto en el agua como en tierra, y en el rango de temperaturas del hábitat en el que viven. Esta energía que precisan, la pueden producir de manera aeróbica o anaeróbica, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren (si hay falta de O₂ o no). Al vivir en un ambiente en el cual la disponibilidad de O₂ varía tanto, los cangrejos intermareales dependen de la anaerobiosis (además de las rutas aeróbicas) para producir la energía necesaria para llevar a cabo su actividad (Burke, 1979).

Dentro de los cangrejos intermareales, destaca la familia Grapsidae como una de las más ricas, en términos de especies intermareales. En la familia Grapsidae, el cangrejo más común en las zonas intermareales rocosas de Europa a lo largo del mar Mediterráneo, el mar Negro y el noreste del mar Atlántico (incluyendo Marruecos, islas Canarias, Azores y Madeira), es el *Pachygrapsus marmoratus* (también llamado cangrejo zapatero) (Katsanevakis et al., 2007; Cannicci et al., 2007), que es objeto del presente estudio. *P. marmoratus* posee un caparazón cuadrangular en ocasiones más largo que ancho, de color marrón oscuro casi negro, con una zona ventral pálida, 2 dientes colocados debajo de los ojos y una pinza más grande que la otra. Además exhibe

un hábito de vida semiterrestre, y es omnívoro, se alimenta de lapas, mejillones y algas filamentosas, lo cual provoca que tenga una gran importancia ecológica a nivel de control sobre las comunidades de animales de las que se alimenta (Cannicci et al., 2002; Cannicci et al., 2007; Cannicci et al., 1999).

Como se ha dicho anteriormente, los cangrejos intermareales se mantienen activos bajo condiciones ambientales extremas, como la hipoxia, y *P. marmoratus* no es una excepción. Con objeto de realizar una aproximación a la relación existente entre la concentración de oxígeno del medio y la tasa de consumo de oxígeno de *P. marmoratus* con su tamaño, se llevó a cabo un estudio del grado de oxidependencia del animal.

El grado de oxidependencia es una medida de la dependencia de un organismo de la concentración de O_2 del medio. Se obtiene dividiendo la tasa de descenso de la tasa de consumo de oxígeno en el tiempo entre la tasa de respiración inicial. La tasa de consumo de oxígeno (VO_2), o tasa metabólica aeróbica representa, en condiciones normales, una medida de los costes energéticos asociados a los procesos vitales. La difusión de oxígeno al interior de un organismo depende de su concentración en el medio ($[O_2]$) por lo que esta tasa se vería afectada por la disponibilidad de este gas (influenciada a su vez por otras condiciones ambientales como la temperatura o la salinidad). La mayor o menor capacidad de mantener la tasa aeróbica en condiciones de hipoxia (carencia parcial de O_2) es una medida de la capacidad compensatoria de los animales basada en la regulación. Si no se da esta función regulatoria, los organismos tienen que desarrollar mecanismos de tolerancia a la escasez de oxígeno en sus tejidos para poder sobrevivir a la hipoxia.

Por tanto, en función del comportamiento de la tasa respiratoria en condiciones de hipoxia los organismos animales se pueden clasificar en dos categorías: Por un lado están los organismos “oxidependientes”(u “oxiconcordantes”), los cuáles varían su tasa de consumo de oxígeno dependiendo de la concentración de oxígeno (PO_2) que posee el medio; Por otro lado se encuentran los organismos “oxirreguladores”, que compensan una caída en la concentración de oxígeno del medio con un aumento de la conductancia de O_2 , ya sea a través de una mayor tasa de ventilación o de circulación del oxígeno (Herreid II, 1980; McMahon, 1988). Los “oxirreguladores” suelen presentar un rango de concentración de oxígeno, a lo largo del cual se produce la regulación de la tasa de consumo. Al límite inferior de ese rango de concentración se le denomina presión crítica

de O₂ (P_c), y se encuentra influenciado por variables como la temperatura, la salinidad o el tamaño. Esta última variable endógena ha sido también considerada en este trabajo en relación con el grado de oxidependencia.

Modelos y grado de oxidependencia

Las categorías de oxiconcordante y oxirregulador son descriptivas y no proporcionan una medida cuantitativa que permita comparar entre grados de oxidependencia variable. En consecuencia, se han propuesto distintos índices cuantitativos de oxidependencia basados en diferentes expresiones matemáticas (modelos) que relacionan la tasa de consumo de oxígeno con su concentración externa. El más utilizado ha sido el índice K₁/K₂ o a/b, basado en una transformación lineal de un modelo hiperbólico (Newell, 1979), pero en este índice se asume la propiedad de que la línea hiperbólica pasa por el origen de coordenadas y no resulta práctico en aquellos casos en que la tasa respiratoria se hace 0 antes de que el oxígeno ambiental se haya consumido totalmente (anoxia).

El modelo que utilizaremos en este trabajo evita este inconveniente y se basa en la observación de que, en un sistema cerrado, la actividad respiratoria del animal reduce la concentración de oxígeno en función del tiempo según una dinámica que puede expresarse mediante la siguiente ecuación cuadrática:

$$y = A - B_1x + B_2x^2$$

Donde “y” es la concentración de oxígeno, “x” el tiempo y A (concentración inicial de oxígeno), B₂ y B₁ son los parámetros de la ecuación. Para establecer el índice (o grado) de oxidependencia, se reagrupan los términos de esta ecuación, y se dividen entre “x” (el tiempo), obteniéndose la siguiente ecuación:

$$(A - y)/x = B_1 + B_2x$$

Como (A - y)/x es equivalente a la tasa de consumo de oxígeno (VO₂), se deduce que B₁ representa la tasa respiratoria instantánea y B₂ representa la tasa de descenso de la tasa respiratoria con el tiempo (x) (Figura 1). B₂ puede considerarse como producto de 2 factores: Por un lado del factor de descenso de la tasa respiratoria con la concentración de oxígeno, o grado de oxidependencia (que es lo que se quiere determinar); Y por otro lado del descenso de la concentración de oxígeno con el tiempo,

que es dependiente de la tasa respiratoria instantánea (B1). Para descartar este segundo factor, sólo hay que dividir B2 entre B1, con lo que el índice B2/B1 constituye una medida del grado de oxidependencia (Prácticas FAA, 2015). De esta manera se obtiene el indicador del grado de dependencia del oxígeno que poseen los ejemplares de *P. marmoratus*, es decir, si son “oxireguladores” u “oxiconcordantes”.

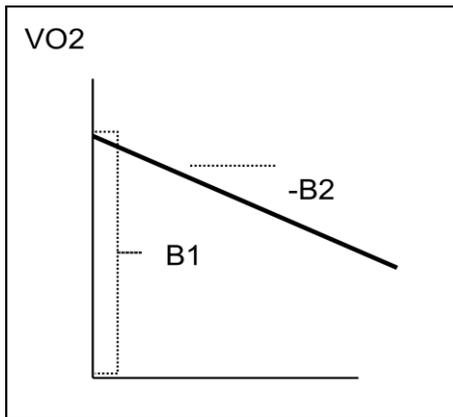


Figura 1. Gráfica que representa el modelo cuadrático propuesto para calcular VO₂, [O₂] y el grado de oxidependencia. B₂: tasa de descenso de la tasa respiratoria en el tiempo; B₁: tasa respiratoria instantánea.

Diversos estudios han realizado determinaciones de cómo varía la tasa de consumo de oxígeno de cangrejos intermareales en condiciones de hipoxia, con factores ambientales como la temperatura (Katsanevakis et al., 2007; Taylor and Wheatly, 1979), observándose un descenso de la demanda de oxígeno en ambientes más frescos, así como un descenso de la pérdida de O₂ por transpiración. O también cómo la presencia de hemocianina en el sistema circulatorio de algunos crustáceos provoca que puedan aprovechar mejor el O₂ y por tanto, vivir en ambientes hipóxicos (Burnett, 1979).

En este trabajo se aborda la determinación de la tasa de consumo de oxígeno (VO₂) en ejemplares de *P. marmoratus* (cangrejo intermareal) comprendidos en un rango de tallas lo suficientemente amplio, como para diferenciar 3 grupos de ejemplares según su peso. Además, a partir de la tasa de consumo de oxígeno, se pretende hallar el grado de oxidependencia para los 3 tamaños de *P. marmoratus*, de forma que posteriormente se pueda realizar un análisis comparativo que pretenda establecer si hay diferencias significativas entre los grados de oxidependencia y las tasas de consumo de oxígeno en los diferentes tamaños. La hipótesis del trabajo es que la mayor tasa de

consumo de oxígeno por unidad de peso y la mayor capacidad de regulación (menor índice de oxidependencia) corresponderá a los ejemplares de menor peso, mientras que los de mayor peso poseerán una VO_2 menor por unidad de peso y una menor capacidad de regulación (mayor índice de oxidependencia). Por otro lado, la mayor tasa de consumo de oxígeno absoluta corresponderá a los ejemplares de mayor tamaño, mientras que los ejemplares más pequeños poseerán una tasa de consumo de oxígeno absoluta menor. Los resultados de este trabajo pueden complementarse con los obtenidos en estudios sobre el ritmo cardíaco de *P. marmoratus* (De Pirro et al., 1999) o en estudios sobre su actividad (Houlihan and Innes, 1984; Burke, 1979) y compararse con los estudios realizados alrededor de la otra especie de cangrejo intermareal rocoso más común, *Carcinus maenas* (Aldrich, 1986).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y mantenimiento de los animales

Los ejemplares de cangrejo se recogieron a mano durante la bajamar, en la playa de Barinatxe (Sopelana, Bizkaia). Se obtuvieron un total de 33 especímenes que presentaban un rango amplio de tamaños dado que, entre los objetivos del trabajo se encontraban: 1) Establecer las relaciones alométricas del metabolismo con el peso y 2) Establecer si el grado de oxidependencia es dependiente de la talla. Se utilizaron ejemplares que se encontraban en un rango de peso que iba de 0,48 a 9 gramos aproximadamente, y se dividieron en 3 tamaños. Los cangrejos de tamaño grande poseían un rango de peso comprendido entre 4,7-9 gramos; Los medianos presentaban un rango comprendido entre 2,7-4,6 gramos; Y el rango de los pequeños estaba comprendido entre 0,48-2,6 gramos. En el laboratorio, todos los ejemplares se mantuvieron en un tanque con aireación constante, dentro de un sistema de agua de mar recirculante regulado a una temperatura de 16°C y con un mismo régimen de alimentación (mejillones recién sacrificados suministrados cada 2-3- días).

Diseño experimental

Para la determinación de las tasas de consumo de oxígeno, se utilizaron respirómetros, consistentes en unos recipientes los cuáles se sellaban con un tapón perforado, a través del cual se insertaba una sonda de oxígeno (LDO de HACH (LANGE)) conectada a un oxímetro (Medidor HQ40d multi electrodo de oxígeno STD

HACH (LANGE)). El volumen de los respirómetros variaba en función del tamaño de los cangrejos, por lo que se utilizaron 2 tamaños: Los respirómetros grandes (con una capacidad de 260-320 ml), que se utilizaron con los cangrejos de mayor tamaño y los respirómetros pequeños (con una capacidad de 140-160 ml), que se utilizaron con los cangrejos de tamaño mediano y pequeño. Las medidas respirométricas se efectuaban a la temperatura en la que habían sido mantenidos los cangrejos (16°C) en un baño termostatzado por medio de un refrigerado portátil provisto de regulación térmica (“dedo frío”).

Procedimiento

Para determinar la tasa de consumo de oxígeno el procedimiento que se siguió fue el mismo para los 3 tamaños de cangrejos. Primero se preparó el baño termostatzado de agua salada a 16°C, donde se colocarían posteriormente los respirómetros llenos de agua saturada de aire a 16°C con los cangrejos en su interior (excepto en un respirómetro que solo contendría agua y serviría de control para comprobar la estabilidad de la concentración de oxígeno durante el período de medida). Con todos llenos de agua y los cangrejos dentro se taparon los respirómetros con los tapones perforados, procurando que no se formasen burbujas de aire, ya que podrían provocar errores en la medida de la concentración de oxígeno por parte de las sonda. Tapando los respirómetros se logró, por un lado, que los cangrejos no escapasen del respirómetro y se mantuviesen dentro de él en todo momento, y por otro lado, que al introducir la sonda dentro del respirómetro a través del tapón, se evitase la entrada o la salida de oxígeno del agua del respirómetro, por lo que la concentración de oxígeno solo bajará por la actividad metabólica del animal.

Una vez alcanzada la temperatura del baño a 16°C, los respirómetros dentro del baño con los cangrejos, y las sondas dentro de los respirómetros, se procedió a realizar la toma de medidas de la concentración de oxígeno en cada uno de los respirómetros. Para ello, estaban las sondas conectadas a oxímetros (aparatos que miden la concentración de oxígeno en el agua) y se realizaban medidas cada 5 minutos, las cuáles se anotaban en una hoja de Excel. Cuando se observaba que la concentración de oxígeno se asintotizaba (supuestamente se alcanzaba la presión crítica de O₂) se interrumpía la medida. Finalmente, se procedía a pesar los cangrejos y medir el volumen de agua de los respirómetros.

Tratamiento de datos

Una vez concluido el experimento, los valores de concentración de O₂ recogidos a intervalos de 5 minutos se volcaron en una hoja de cálculo Excel con la que se obtuvieron gráficas de dispersión de puntos. Las series de puntos correspondientes a cada animal se ajustaban mediante una regresión polinómica de orden 2, registrándose la correspondiente ecuación de segundo grado. Una vez se obtuvieron las ecuaciones cuadráticas, se realizaron 2 estudios diferentes: El primero en el que se calculó el índice de oxidependencia (B₂/B₁) para los tres grupos de talla considerados y el segundo, en que se estableció la dependencia entre la tasa de consumo de oxígeno individual en normoxia (representada por el valor de B₁) y el peso de los animales.

Antes de hacer los cálculos necesarios para realizar la primera parte del estudio, se analizaron los valores obtenidos y se descartaron los especímenes que no alcanzaron la presión crítica de O₂. Como se ha indicado en la introducción, los datos de concentración de oxígeno en función del tiempo obtenidos para cada ejemplar se ajustaban mediante el siguiente modelo cuadrático:

$$(1) y = a - B_1x + B_2x^2$$

Siendo “y” la concentración de oxígeno y “x” el tiempo en el que se midió esa concentración.

VO₂ vs peso

Tras obtener las gráficas de [O₂] vs tiempo, se procedió a estudiar las relaciones alométricas entre la tasa respiratoria y el tamaño de los cangrejos. En esta primera parte del estudio, no se descartaron los especímenes que no alcanzaron la presión crítica, ya que no era necesario alcanzarla para que se pudiesen calcular y representar los valores. Se calculó la tasa instantánea de consumo de oxígeno (en ausencia de efectos de hipoxia), y a partir del valor de esa tasa se estimó VO₂ a través de esta ecuación:

$$(2) VO_2 = B_1 \times V \times 0,7$$

Donde B₁ representa la tasa respiratoria instantánea (en normoxia), es decir, el descenso de la [O₂] en mg/l por hora, y V representa el volumen del respirómetro en litros. Con VO₂ calculado, se procedió a la representación de la gráfica de VO₂ frente a peso. Sin embargo, para establecer las relaciones alométricas entre las tasas fisiológicas

y el peso vivo (W: g) se realizó una nueva gráfica a partir de los logaritmos de los valores obtenidos previamente de VO_2 y peso (W). Estas relaciones alométricas fueron expresadas de acuerdo a la ecuación

$$(3) \quad VO_2 = a \cdot W^b$$

En la cual la constante de proporcionalidad (a) y el exponente de la masa (b) se obtuvieron a partir de la ecuación de regresión lineal ajustada a los datos transformados logarítmicamente.

Grado de oxidependencia

A continuación, se realizó un análisis comparativo del grado de oxidependencia entre los 3 tamaños de cangrejos. El grado de oxidependencia para cada individuo se calculó a partir de la ecuación de orden 2 obtenida anteriormente para calcular la concentración de oxígeno predicha. Para calcular el grado de oxidependencia individual se dividió B_2/B_1 , donde B_2 es la tasa de descenso de la tasa respiratoria en el tiempo y B_1 es la tasa respiratoria instantánea. En este caso se volvieron a excluir los especímenes que no alcanzaron su presión crítica (por lo que no se calculó su grado de oxidependencia) y posteriormente se calcularon las medias y desviaciones estándar para cada tamaño de cangrejo a través del programa estadístico SPSS. Para realizar la comparación con las medias y desviaciones estándar de los 3 tamaños se llevó a cabo un análisis estadístico con ANOVA y test post-hoc, para dilucidar si existían diferencias significativas en los grados de oxidependencia asociadas al tamaño.

VO_2 vs $[O_2]$

Después del análisis comparativo, y comprobar la existencia o no de diferencias significativas en el grado de oxidependencia en los distintos tamaños de ejemplares, se procedió a realizar una simulación final, representando la tasa de consumo de oxígeno (VO_2) vs la concentración de oxígeno en el medio ($[O_2]$) para los distintos tamaños de *P. marmoratus*. De no haber diferencias significativas entre alguno de los distintos tamaños, los valores de estos se agruparían y se representarían como una única curva. A efectos de esta simulación, los valores de VO_2 y de $[O_2]$ se siguió el modelo propuesto para el grado de oxidependencia con B_2 y B_1 :

$$(4) \text{VO}_2 = [(C_0 - C_t)/t] \times V \times 0,7 = [1 - (B_2/B_1)] \times t \times V \times 0,7 \quad (\text{eje ordenadas})$$

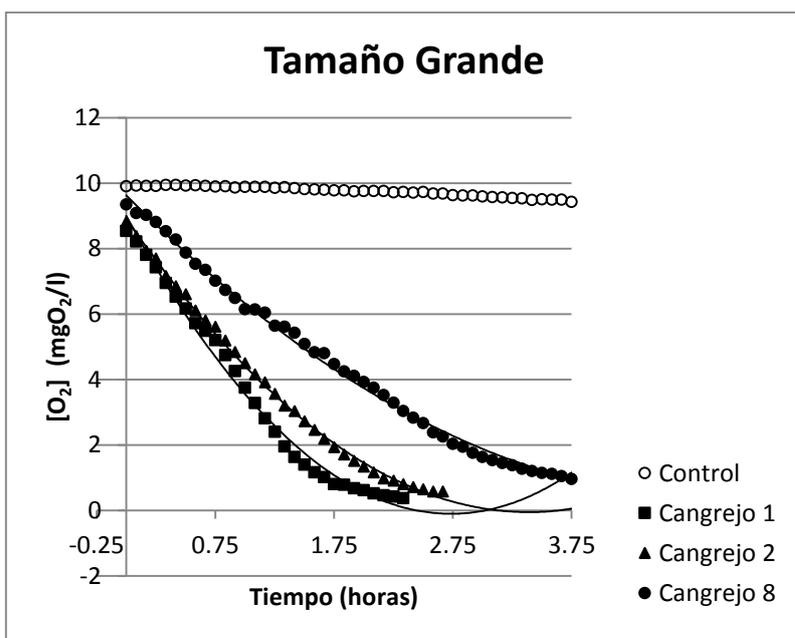
$$(5) C_0 - C_t = t - (B_2/B_1) \times t^2 \quad (\text{eje abscisas})$$

Dónde C_0 y C_t son la concentración de oxígeno al inicio del intervalo de tiempo (t) y la concentración de oxígeno al final del intervalo de tiempo respectivamente, y el término $C_0 - C_t$ es la $[\text{O}_2]$. Estas ecuaciones generan valores de VO_2 y de $[\text{O}_2]$ que permiten simular la dependencia de VO_2 vs $[\text{O}_2]$ en los distintos grupos de tamaño que presentan diferencias estadísticamente significativas en sus grados de oxiconcordancia u oxidependencia.

RESULTADOS

[O₂] del medio vs Tiempo

La Figura 2 muestra las gráficas correspondientes a la variación en el tiempo de la concentración de oxígeno del agua (mgO_2/l) para cada uno de los 3 tamaños de cangrejos zapateros (*Pachygrapsus marmoratus*). En cada una de las gráficas se presentan, a modo de ejemplo, las series correspondientes a 3 de los ejemplares de cada grupo (de un total de 11 ejemplares medidos) junto con la correspondiente al control. Se representan también los ajustes polinómicos de estas series de puntos, cuyas ecuaciones se presentan en la Tabla 1, junto con los coeficientes de determinación.



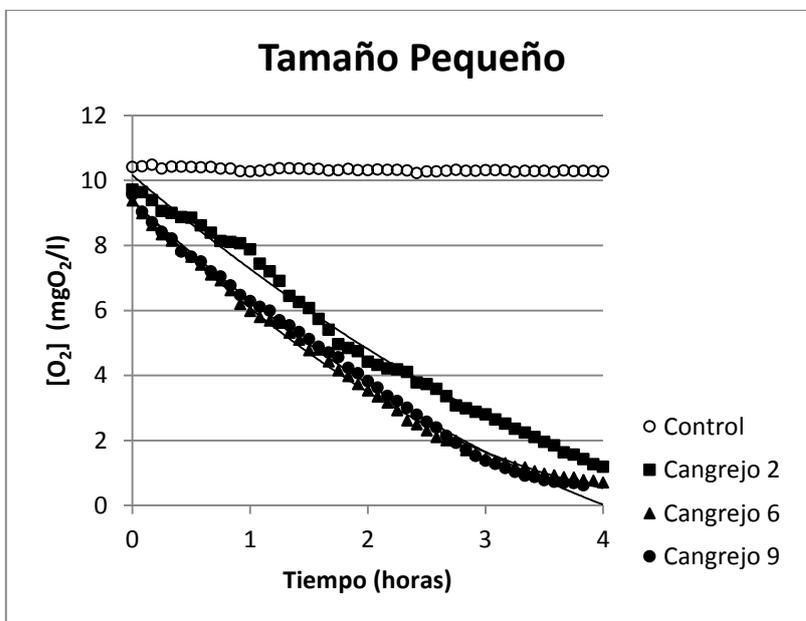
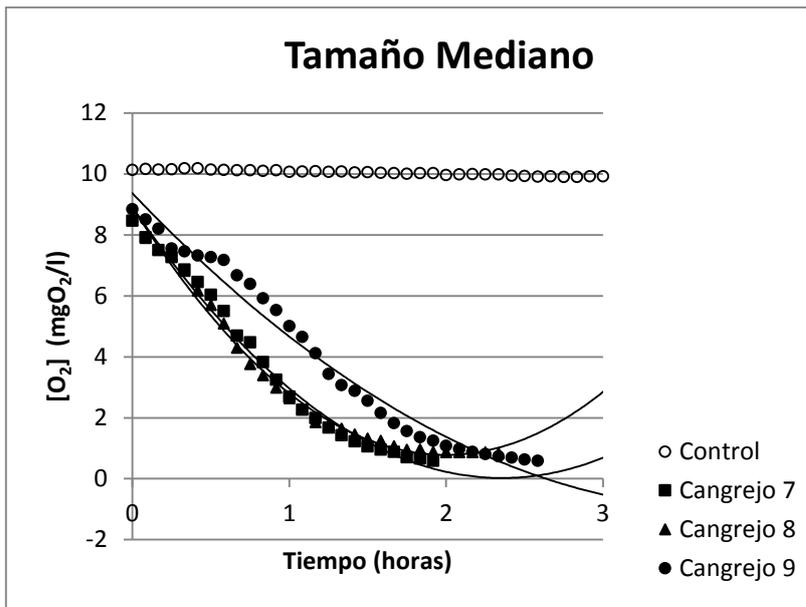


Figura 2. Variación de la concentración de oxígeno del respirómetro a lo largo del tiempo, medida en intervalos de 5 minutos (0,083 h). Cada una de las gráficas representa un tamaño de *Pachygrapsus marmoratus*, con un rango de peso diferente para cada tamaño. Los grandes poseen un rango que va de 4,7 a 9 gramos, los medianos de 2,7 a 4,6 gramos y los pequeños de 0,48 a 2,6 gramos. Se representan solo 3 de los 11 cangrejos de cada tamaño (mas el control), y sus respectivas líneas de regresión.

Se puede observar como los especímenes grandes y medianos al desarrollar una actividad respiratoria mayor, disminuyen de una manera más rápida la $[O_2]$ del medio que los especímenes pequeños, por lo que alcanzan antes su presión crítica de O_2 (asintotización de la línea).

Tabla 1. Ecuaciones de segundo grado, de la forma $Y = a - B_1 * X + B_2 * X^2$ y valores de R cuadrado correspondientes a cada uno de los ejemplares de *P. marmoratus* de los distintos tamaños.

	Tamaño Grande	Tamaño Mediano	Tamaño Pequeño
Cangrejo 1	$y = 1,2144x^2 - 6,6561x + 9,0095$ $R^2 = 0,9903$	$y = 0,0689x^2 - 2,1666x + 8,7448$ $R^2 = 0,9976$	$y = 0,16x^2 - 2,8254x + 9,8031$ $R^2 = 0,9913$
Cangrejo 2	$y = 0,7818x^2 - 5,2984x + 8,9269$ $R^2 = 0,9984$	$y = 0,3364x^2 - 3,8097x + 9,6345$ $R^2 = 0,9909$	$y = 0,2106x^2 - 3,1063x + 10,19$ $R^2 = 0,9922$
Cangrejo 3	$y = 0,1239x^2 - 2,6855x + 9,4453$ $R^2 = 0,9856$	$y = 1,3308x^2 - 7,2711x + 9,9199$ $R^2 = 0,9876$	$y = -0,0503x^2 - 1,2701x + 8,9631$ $R^2 = 0,9788$
Cangrejo 4	$y = -0,0465x^2 - 1,8635x + 8,0778$ $R^2 = 0,9945$	$y = -0,0073x^2 - 1,6167x + 9,0745$ $R^2 = 0,9976$	$y = 0,0427x^2 - 1,5971x + 9,2529$ $R^2 = 0,9997$
Cangrejo 5	$y = 0,2186x^2 - 2,6646x + 7,2214$ $R^2 = 0,9981$	$y = -0,077x^2 - 2,6259x + 8,871$ $R^2 = 0,9733$	$y = 0,0547x^2 - 0,8104x + 9,5035$ $R^2 = 0,9955$
Cangrejo 6	$y = 0,7958x^2 - 5,3193x + 9,403$ $R^2 = 0,9961$	$y = 0,959x^2 - 6,0912x + 9,3091$ $R^2 = 0,9827$	$y = 0,3687x^2 - 3,6904x + 9,396$ $R^2 = 0,9977$
Cangrejo 7	$y = 0,5013x^2 - 4,0641x + 8,7442$ $R^2 = 0,9915$	$y = 1,6026x^2 - 7,5494x + 8,9151$ $R^2 = 0,9889$	$y = 0,0361x^2 - 1,3432x + 9,3106$ $R^2 = 0,9941$
Cangrejo 8	$y = 0,3586x^2 - 3,6578x + 9,6396$ $R^2 = 0,9962$	$y = 2,0445x^2 - 8,1544x + 8,9134$ $R^2 = 0,9939$	$y = -0,0025x^2 - 2,2908x + 10,102$ $R^2 = 0,9881$
Cangrejo 9	$y = 0,049x^2 - 1,6822x + 9,1024$ $R^2 = 0,9914$	$y = 0,7024x^2 - 5,4266x + 9,4193$ $R^2 = 0,9804$	$y = 0,2372x^2 - 3,2813x + 9,3559$ $R^2 = 0,997$
Cangrejo 10	$y = 0,1225x^2 - 2,1582x + 8,6103$ $R^2 = 0,9941$	$y = 0,1907x^2 - 3,0974x + 9,4734$ $R^2 = 0,993$	$y = 0,005x^2 - 2,2626x + 9,2131$ $R^2 = 0,9928$
Cangrejo 11	$y = 0,1077x^2 - 2,2815x + 9,4998$ $R^2 = 0,9949$	$y = 0,9872x^2 - 6,0506x + 9,527$ $R^2 = 0,9841$	$y = 0,1402x^2 - 2,8694x + 9,7167$ $R^2 = 0,9977$

VO₂ vs Peso

A partir de las ecuaciones cuadráticas obtenidas en cada una de las líneas de estas primeras gráficas se calculó la VO₂ (ml/h). Para estimar VO₂ se utilizó el parámetro B₁ de las ecuaciones cuadráticas, que representa la tasa instantánea de descenso de la concentración de oxígeno en condiciones de normoxia. Utilizando la fórmula (2) mencionada anteriormente se obtuvieron los valores de VO₂.

Con el fin de ver si existe una relación significativa entre la VO_2 y el peso de los especímenes de *Pachygrapsus marmoratus* se realizó una regresión lineal a partir de los valores de VO_2 y del peso transformados logarítmicamente (Figura 3). Se utilizó el ajuste log-log porque presenta un valor mayor de R y se corresponde con la ecuación alométrica anteriormente mencionada. Se pudo observar pues que la regresión era significativa y que el valor de b era 0,82, que no difería significativamente del valor teórico que era 0,75 (Glazier, 2005).

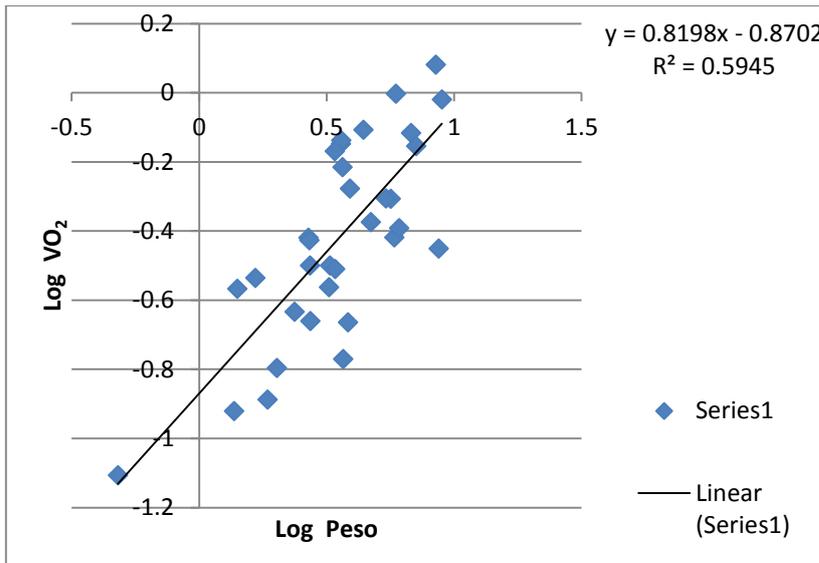


Figura 3. Gráfica que muestra la relación alométrica entre la tasa respiratoria y el peso de *Pachygrapsus marmoratus* para todos los tamaños. La ecuación y coeficiente de determinación corresponden a la línea de regresión logarítmica.

Grado de Oxidependencia

Para realizar un análisis comparativo del grado de oxidependencia en función de los distintos tamaños de *Pachygrapsus marmoratus*, se calculó el índice B_2/B_1 de cada espécimen individual (siempre y cuando este hubiera alcanzado su presión crítica de O_2), dentro de los 3 grupos de talla. Para realizar el análisis comparativo, se calculó la media y la varianza de los valores del índice de oxidependencia correspondientes a cada grupo (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de las medias, desviaciones típicas, errores típicos e intervalos de confianza (95%) del grado de oxidependencia para diferentes tamaños de *Pachygrapsus marmoratus*. Cada uno de los números de la parte izquierda hace referencia a un tamaño, siendo 1 = Tamaño Grande; 2 = Tamaño Mediano; y 3 = Tamaño Pequeño.

Oxidependencia

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la		Mínimo	Máximo
					media al 95%			
					Límite inferior	Límite superior		
1	7	,118486	,0463347	,0175129	,075633	,161338	,0462	,1824
2	7	,169143	,0532600	,0201304	,119886	,218400	,0882	,2507
3	8	,058388	,0244590	,0086476	,037939	,078836	,0268	,1000
Total	22	,112750	,0618071	,0131773	,085346	,140154	,0268	,2507

La prueba de homogeneidad para varianzas (Tabla 3), se utilizó para contrastar la igualdad de las varianzas. A través del valor del estadístico de Levene, se puede concluir que al poseer un valor suficientemente pequeño, la varianza de los errores se mantiene constante.

Tabla 3. Prueba de homogeneidad para las varianzas, con el valor del estadístico de Levene, y el grado de significación.

Oxidependencia

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,738	2	19	,203

En relación con las medias del grado de oxidependencia, el test de comparación de medias (Tukey) indica que las medias correspondientes a los grupos de especímenes grandes y medianos no difieren de manera significativa entre ellas, pero si difieren de manera significativa con respecto a la media de los pequeños (Tabla 4 y Figura 4).

Tabla 4. Prueba Post-hoc de Tukey/Kramer. Comparación de la media del grado de oxidependencia entre los 3 tamaños de *Pachygrapsus marmoratus*. También se representan los errores típicos, los niveles de significación y los intervalos de confianza (95%).

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente Oxidependencia							
	(I) 1 = Grande; 2 = Mediano; 3 = Pequeño	(J) 1 = Grande; 2 = Mediano; 3 = Pequeño	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	1	2	-,0506571	,0226410	,090	-,108175	,06861
		3	,0600982*	,0219220	,033	,004406	,115790
	2	1	,0506571	,0226410	,090	-,006861	,108175
		3	,1107554*	,0219220	,000	,055064	,166447
	3	1	-,0600982*	,0219220	,033	-,115790	-,004406
		2	-,1107554*	,0219220	,000	-,166447	-,055064

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

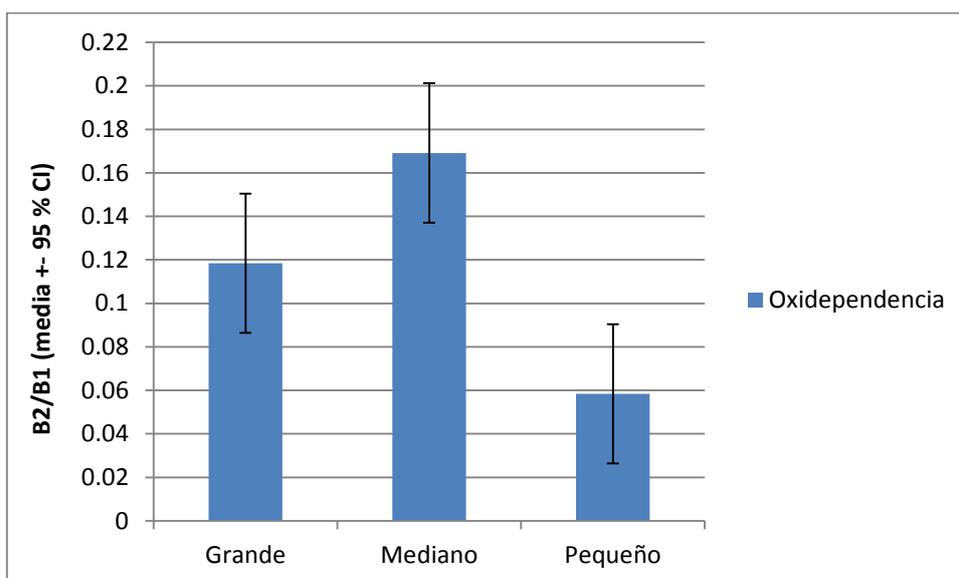


Figura 4. Histograma comparativo de las medias del índice de oxidependencia en los 3 tamaños de *Pachygrapsus marmoratus* con sus intervalos de confianza al 95 %.

VO₂ vs [O₂]

Con la demostración de la existencia de diferencias significativas entre las medias de los especímenes grandes y medianos con los pequeños, se realiza una simulación final en la cual se lleva a cabo el modelizado de las curvas de VO₂ vs [O₂] de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección de Materiales y Métodos

(ecuaciones 4 y 5), obteniéndose las correspondientes 2 curvas, una perteneciente a los especímenes pequeños y otra perteneciente a los especímenes grandes y medianos (Figura 5). Se puede observar cómo, la VO_2 de los especímenes grandes y medianos posee valores mayores al comienzo de las medidas cuando la concentración de oxígeno (en mlO_2/l) del agua es mayor, y a medida que pasa el tiempo la VO_2 desciende de manera rápida, al encontrarse el animal con menos oxígeno en el medio. Lo contrario ocurre en los especímenes de pequeño tamaño, que empiezan con unos valores menores de VO_2 respecto a los de los especímenes grandes y medianos y mantienen una VO_2 constante durante más tiempo, por lo que la concentración de oxígeno del medio desciende de una manera más gradual y menos brusca y tardan más tiempo en quedarse sin oxígeno para llevar a cabo su actividad respiratoria.

Estas diferencias pueden observarse también en los valores de las ecuaciones cuadráticas de ambas curvas (valores mayores en individuos mayores y menores en individuos menores), y en los valores de R cuadrado (valor mayor en individuos menores y valores menores en individuos mayores).

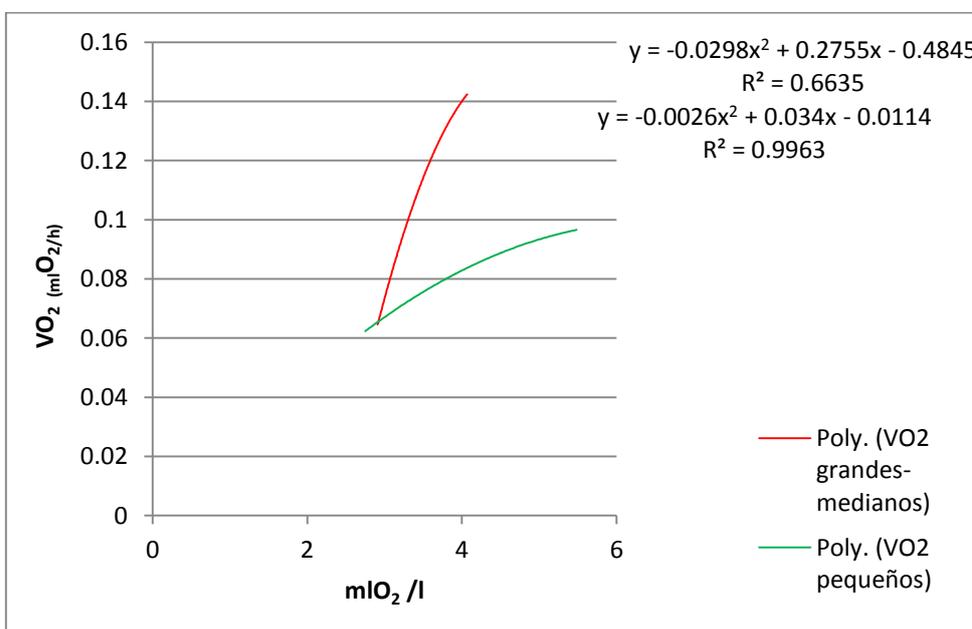


Figura 5. Simulaciones de las curvas VO_2 vs $[O_2]$ para los individuos grandes y medianos (roja) e individuos pequeños (verde) con las líneas de regresión polinómica de orden 2, con sus ecuaciones cuadráticas y valores de R cuadrado correspondientes.

DISCUSIÓN

Al abordar el estudio comparado del grado de oxidependencia para los 3 distintos tamaño de ejemplares de *P. marmoratus*, es esencial considerar las relaciones entre las tasas fisiológicas y el tamaño de los ejemplares, dado que la oxidependencia puede depender de la tasa de consumo de oxígeno peso específica, que varía inversamente con la masa corporal que posea cada individuo (Katsanevakis et al., 2007).

La relación entre la tasa de consumo de oxígeno (o tasa metabólica) y el peso de los organismos ha sido motivo de estudio en numerosos trabajos fisiológicos. Para explicar las relaciones alométricas entre la tasa metabólica y el peso de los organismos, hay que tener en cuenta la ley de Kleiber la cuál expone que la tasa metabólica de un organismo es proporcional a su masa corporal elevada a la potencia 3/4. El valor de b obtenido en el estudio (Figura 4) es de 0,82, que no difiere significativamente del 0,75 teórico, y tampoco difiere significativamente del valor de b calculado para el orden Decapoda (orden al cual pertenece *P. marmoratus*) que es de 0,718 (Glazier, 2005). Se puede concluir pues, que la regresión potencial de VO_2 vs peso que se ha obtenido es significativa, es decir, que existe una relación alométrica entre la tasa metabólica y el peso de los ejemplares de *P. marmoratus*.

Houlihan e Innes (1984) recogieron unos valores de b para *P. marmoratus* de 0,654 y de 0,410 a 2 temperaturas distintas, valores mucho más bajos que los recogidos en el presente estudio. Sin embargo, en este estudio Houlihan e Innes aclimataron los ejemplares a temperaturas de 20°C ($b=0,654$) y de 30°C ($b=0,410$) (los utilizados en este estudio estaban aclimatados a 16°C) además de que presentaron un rango de peso estrecho (en este estudio se utilizó un rango de pesos más amplio). Probablemente, una de las causas que provoca que los valores de b sean tan diferentes sea la temperatura de aclimatación, ya que el aumento de la temperatura provoca que se rompa la proporcionalidad entre la tasa metabólica del organismo y su masa corporal. La mayor temperatura de aclimatación, unida al rango más estrecho de tallas que utilizaron, posiblemente sean las causas de el valor tan bajo de b en el estudio de Houlihan e Innes.

De la misma manera Katsanevakis et al., (2007) también estimó los valores de b de las relaciones alométricas respiración-peso para *P. marmoratus*. En este caso el valor obtenido fue de 0,75, un valor mucho más parecido al obtenido en este trabajo, que

cumple la ley de Kleiber. Posiblemente, esto sea debido a que el estudio de Katsanevakis fue más preciso, ya que aclimató a los cangrejos a temperaturas más parecidas a las de su hábitat (13,5-28°C) y utilizó un rango de pesos más amplio.

En relación al grado de oxidependencia (Figura 4) al realizar la comparación interespecífica de las varianzas de estos (ANOVA Tabla 2 y 3) en las 3 diferentes tallas, se observa que no existen diferencias significativas entre los ejemplares grandes y medianos de *P. marmoratus*, pero que si existe una diferencia significativa entre los grados de oxidependencia de los grandes y los medianos con los ejemplares pequeños.

Para corroborar los resultados de la comparación, se realizó una prueba post-hoc de Tukey-Kramer (Tabla 4), la cual confirmó la ausencia de diferencias significativas entre los grados de oxidependencia de los ejemplares grandes y los medianos, y la existencia de diferencias significativas entre los ejemplares grandes-medianos y los pequeños, a través de la comparación de las medias de oxidependencia en cada rango de talla. En ambas pruebas, se obtenía un grado de oxidependencia mayor (tanto en medias como en varianzas) para los ejemplares grandes y medianos (con una ligera superioridad de los medianos) y un grado de oxidependencia menor en los ejemplares pequeños.

La ausencia de diferencias significativas entre los grados de oxidependencia de los ejemplares grandes y medianos, permite que los valores de VO_2 frente a la concentración de O_2 del medio se representen de manera conjunta y se pueda comparar con los valores de VO_2 vs $[O_2]$ de los ejemplares pequeños (Figura 5), que al compararlos se podía ver como la tasa de consumo de oxígeno VO_2 (o tasa respiratoria) desciende de una manera más rápida con la concentración de oxígeno en los ejemplares de mayor tamaño, lo que es la expresión gráfica los resultados obtenidos al analizar el grado de oxidependencia.

Por lo tanto, parece existir una relación entre mayores tasas metabólicas por unidad de peso en los ejemplares pequeños (como se desprende de la alometría negativa: $b < 1$ para la relación respiración-peso) y su mayor capacidad de regulación, dado que su tasa de descenso de la tasa respiratoria con el descenso de la concentración de oxígeno es menor que los ejemplares de mayor tamaño.

Comparando estos resultados con los obtenidos en otros estudios realizados sobre la otra especie de cangrejo intermareal típica de nuestras costas, *Carcinus maenas*, se puede observar como ejemplares de esta especie aclimatados a distintas temperaturas, expuestos a distintos medios (acuático marino y terrestre) y con un rango de tallas más amplio que en el estudio presente, los valores de VO_2 por unidad de peso más altos corresponden a los ejemplares de menor tamaño, tanto en ambiente acuático como en ambiente terrestre (Taylor and Wheatly, 1979; Taylor and Butler, 1973; Taylor and Butler, 1978). También se pueden encontrar estudios realizados sobre *Carcinus maenas* que poseen resultados sobre la tasa de consumo de oxígeno absoluta la cuál es mayor en ejemplares más grandes (Hamilton and Houlihan, 1992). A través de los resultados de estos estudios se puede observar, como los ejemplares de mayor tamaño poseen un carácter más “oxiconcordante”, es decir varían su tasa de consumo de oxígeno en función de la concentración de oxígeno en el medio, mientras que los ejemplares de menor tamaño poseen un carácter más “oxirregulador”, esto es, que compensan una caída de la concentración de oxígeno del medio con un aumento de la conductancia del O_2 .

En resumen, las diferencias en la tasa de consumo de oxígeno (VO_2) y el grado de oxidependencia encontradas entre los diferentes tamaños de *P. marmoratus* permiten confirmar la hipótesis previamente propuesta. Para explicar la ausencia de una relación más precisa entre regulación respiratoria y talla (e.g., diferencias significativas en todo el rango de tamaños) habría que considerar el efecto de las diferencias interindividuales en el comportamiento (actividad) asociadas a la diversidad de respuestas funcionales cuando la concentración de oxígeno del medio baja (hipoxia) (Geihs et al., 2013). Otros estudios alrededor de VO_2 en animales intermareales en función de otras variables como temperatura (McGaw and Whiteley, 2012; Jimenez and Bennett, 2005) o la variación latitudinal (Lardies et al., 2010) ofrecen resultados mucho menos variables (a nivel individual sobre todo) lo que permite que se pueda establecer un patrón de incremento o descenso de la VO_2 y del grado de oxidependencia en función de estas variables.

BIBLIOGRAFÍA

Aldrich, J. C., 1986. “The influences of individual variations in metabolic rate and tidal conditions on the response to hypoxia in *Carcinus maenas* (L.)” Comparative Biochemistry and Physiology, 83A (1): 53-60.

- Burke, E. M., 1979. "Aerobic and anaerobic metabolism during activity and hypoxia in two species of intertidal crabs" *The Biological Bulletin*, 156: 157-168.
- Burnett, L. E., 1979. "The effects of environmental oxygen levels on the respiratory function of hemocyanin in the crabs, *Libinia emarginata* and *Ocypode quadrata*" *The Journal of Experimental Zoology*, 210 (2): 289-300.
- Cannicci, S., Paula, J., Vannini, M., 1999. "Activity pattern and spatial strategy in *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda: Grapsidae) from Mediterranean and Atlantic shores" *Marine Biology* 133, 429–435.
- Cannicci, S., Gomei, M., Boddi, B., Vannini, M., 2002. "Feeding habits and natural diet of the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus*: Opportunistic browser or selective feeder?" *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 54: 983-1001.
- Cannicci, S., Gomei, M., Dahdouh-Guebas, F., Rorandelli, R., Terlizzi, A., 2007. "Influence of seasonal food abundance and quality on the feeding habits of an opportunistic feeder, the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus*" *Marine Biology* 151: 1331-1342.
- Geihs, M. A., Maciel F. E., Vargas, M. A., Cruz, B. P., Nery, L. E. M., 2013. "Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae)" *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 445: 69-78.
- Glazier, D. S., 2005. "Beyond the '3/4-power law': variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals" *Biological Reviews*, 80: 611-662.
- Gonzalez Ruano, I., 2009. "Análisis de los factores determinantes de la ictiofauna intermareal de la bahía de Cádiz" Memoria de proyecto final de carrera.
- Herreid II, C. F., 1980. "Hypoxia in invertebrates" *Comparative Biochemistry and Physiology*, 67A: 311-320.
- Hamilton, N. M., Houlihan, D. F., 1992. "Respiratory and circulatory adjustments during aquatic treadmill exercise in the European shore crab *Carcinus maenas*" *Journal of Experimental Biology*, 162: 37-54.

- Houlihan, D. F. and Innes, A. J., 1984. "The cost of walking in crabs: aerial and aquatic oxygen consumption during activity of two species of intertidal crab" *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77A (2): 325-334.
- Jiménez, A. G., Bennett, W. A., 2005. "Respiratory physiology of three indo-pacific fiddler crabs: Metabolic responses to intertidal zonation patterns" *Crustaceana*, 78 (8): 965-974.
- Katsanevakis, S., Xantopoulos, J., Protopapas, N., Verriopoulos, G., 2007. "Oxygen consumption of the semi-terrestrial crab *Pachygrapsus marmoratus* in relation to body mass and temperature: an information theory approach" *Marine Biology*, 151: 343-352.
- Lardies, M. A., Muñoz, J. L., Paschke, K. A., Bozinovic, F., 2011. "Latitudinal variation in the aerial/aquatic ratio of oxygen consumption of a supratidal high rocky-shore crab" *Marine Ecology*, 32: 42-51.
- McGaw, I. J., Whiteley, N. M., 2012. "Effects of acclimation and acute temperature change on specific dynamic action and gastric processing in the green shore crab, *Carcinus maenas*" *Journal of Thermal Biology*, 37: 570-578.
- McMahon, B. R., 1988. "Physiological responses to oxygen depletion in intertidal animals" *American Zoologist*, 28: 39-53.
- Navarro Adorno, E., 2015. "Protocolo de prácticas de Fisiología Animal Ambiental: Práctica 2 VO₂ vs PO₂".
- Newell, R. C., 1970. "Factors affecting the rate of oxygen uptake" *Biology of intertidal animals*, Chapter 2: 606-615; 632-643.
- De Pirro, M., Cannicci, S., Santini, G., 1999. "A multi-factorial experiment on heart rate variations in the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus*" *Marine Biology*, 135: 341-345.
- Taylor, E. W., Butler, P. J., 1973. "The behavior and physiological responses of the shore crab *Carcinus maenas* during changes in environmental oxygen tension" *Netherlands Journal of Sea Research*, 7: 496-505.

Taylor, E. W., Butler, P. J., 1978. "Aquatic and aerial respiration in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), acclimated to 15°C" *Journal of Comparative Physiology*, 127: 315-323.

Taylor, E. W. and Wheatly, M. G., 1979. "The behavior and respiratory physiology of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) at moderately high temperatures" *Journal of Comparative Physiology*, 130: 309-316.